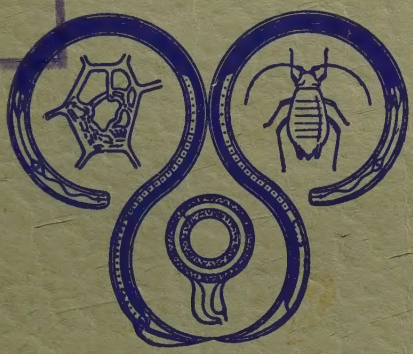
E & A

TIJDSCHRIFT OVER PLANTEZIEKTEN

COMMONWEALTH INST. OF ENTOMOLOGY LIBRARY
12 OCT 1959
MATERIAL Eu.86
SEPARATE

JAARGANG 65 - 1959

3e AFLEVERING



Uitgave van de

NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder Redactie van

Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr. H. H. EVENHUIS;
Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS; Prof. Dr. A. J. P. OORT;
Mevr. Ir. M. POST-BAKKER; en Prof. Dr. J. P. H. VAN DER WANT (Secretaris)

Redactie-adres: Laboratorium voor Bloembollenonderzoek,
Heereweg 345*a*, Lisse

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Dr. P. M. L. Tammes, Wageningen, *Voorzitter*
Ir. J. A. J. Veenenbos, Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, *Secretaris*
Dr. A. P. Kole, Lab. v. Phytopathologie, Binnenhaven 4, Wageningen, *1e Penningmeester*.
Postrekening no. 923165 ten name van Penningmeester van de Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen
Mevr. Ir. M. Post-Bakker, Lawickse Allee 80, Wageningen, *2e Penningmeesteresse*
H. P. Dijksterhuis, Garrelsweer
Dr. Ir. C. Mastenbroek, Hoofddorp
Prof. Dr. A. J. P. Oort, Wageningen
W. Tuin, Zuidwolde
Ir. J. Walrave, Wageningen

Lidmaatschap Ned. Planteziektenkundige Vereniging

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 7,50, België f 7,50, Buitenland f 8.50. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 10,—, België f 10,—. Buitenland f 13,50 Betalingen op postrekening 923165 t.n.v. Penningmeester Ned. Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ⅛ pag. f 12,50; ¼ pag. f 20,—; ½ pag. f 30,—; 1 pag. f 55,—.
Bij 3 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 20 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot de secretaris der Redactie-Commissie, p.a. Heereweg 345*a*, Lisse, tel. 3747, of tot H. Veenman & Zonen N.V. - Wageningen, tel. 2242.

INHOUD

HOOFDARTIKELEN

J. P. H. VAN DER WANT en L. BOS – Geelnervigheid, een virusziekte van luzerne. *With a summary: Vein yellowing, a virus disease of lucerne* 73

W. SPOON en F. E. LOOSJES – Samenstelling en eigenschappen van rotenonhoudende *Mundulea*-Bast. *With a summary: Composition and properties of rotenone containing* Mundulea *bark*. 79

L. BOS, B. DELEVIĆ and J. P. H. VAN DER WANT – Investigations on white clover mosaic virus. *Met een samenvatting: Onderzoekingen over witteklavermozaïekvirus* . . 89

W. HELLE – Het voorkomen van resistentie tegen organische fosforverbindingen bij de bonespintmijt (*Tetranychus urticae*) in Aalsmeer. *With a summary: The occurrence of resistance to organic phosphorcompounds in the two-spotted spider mite* (Tetranychus urticae) *at Aalsmeer* 107

F. E. LOOSJES – The evaluation of anti-coagulants as rodenticides in the laboratory. *Met een samenvatting: Het laboratoriumonderzoek van anti-coagulanten als rodenticiden* 116

Boekbespreking 119

T. Pl.ziekten 65 (1959): 73–78

GEELNERVIGHEID, EEN VIRUSZIEKTE VAN LUZERNE[1]

With a summary:

Vein yellowing, a virus disease of lucerne

DOOR

J. P. H. VAN DER WANT[2] en L. BOS

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

INLEIDING

In het voorjaar van 1950 werden van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen enige luzerneplanten (*Medicago sativa* L.), die op de bladeren een briljante, gele nerftekening vertoonden, ontvangen, met het verzoek na te gaan of hier van een virusziekte sprake kon zijn. Ondanks herhaalde pogingen om met sap uit de betrokken planten een virus op luzerne, klaversoorten, erwt en tuinboon over te dragen, werden hierbij geen resultaten geboekt.

In hetzelfde jaar nam de eerste schrijver in luzernepercelen op Zuid-Beveland verschijnselen waar overeenkomend met die van de planten, welke van de Plantenziektenkundige Dienst waren ontvangen. In latere jaren werden deze symptomen in verscheidene luzernepercelen waargenomen.

Op grond van in dit artikel te beschrijven kasproeven en waarnemingen in het veld kon worden vastgesteld, dat de onderhavige gele nerftekening op de bladeren van luzerne het gevolg is van infectie der desbetreffende planten met het topvergelingsvirus van de erwt.

SYMPTOMEN

Het verschijnsel is gekenmerkt door een regelmatige, scherp begrensde verkleuring van de nerven en het daaraangrenzende bladmoes (fig. 1). De verkleuring kan variëren van lichtgroen, waarbij de breedte van de verkleurde delen smal is, tot intens geel als de verkleuring zich over een groter oppervlak van de bladschijf uitstrekt. Soms blijft slecht weinig bladmoes met een normale groene kleur over. Deze bladeren wijken doorgaans in vorm en grootte niet af van de bladeren van een gezonde plant. Aangezien het patroon van de nervatuur door de vergeling zo sprekend wordt en zeer regelmatig is, stellen wij voor het verschijnsel „geelnervigheid" te noemen.

Merkwaardig is, dat het ziektebeeld veelal in het voorjaar in luzernevelden kan worden waargenomen, doch dat het doorgaans in de loop van de zomer verdwijnt om in het najaar weer te voorschijn te komen. Ook planten met geelnervigheid, die in de kas groeien, vertonen de tendens in de zomer normaal groene bladeren te vormen. Het is niet zeker, waar dit aan geweten moet worden. Vermoedelijk is de hoeveelheid licht, die de planten ontvangen, bepalend voor het al of niet optreden van de verschijnselen van geelnervigheid (zie ook blz. 76).

[1] Aangenomen voor publikatie 20 februari 1959.

[2] Thans Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse.

In juli 1956 werden – naast enige erwteplanten ras Unica – een drietal luzerneplanten, van het in Nederland het meest geteelde ras Du Puits, bezet met verscheidene exemplaren van de erwtebladluis (*Acyrthosiphon pisum* HARRIS), welke geruime tijd hadden gezogen op vergelingszieke erwten, die Ir. N. HUBBELING in een kas op het I.P.O. in observatie had. Twee dagen nadat de luizen op de planten waren geplaatst, werden zij met een insekticideoplossing (TEPP) gedood. De erwteplanten vertoonden na enkele weken symptomen van topvergeling, maar aan de luzerneplanten konden maandenlang geen bijzondere verschijnselen worden waargenomen. In september werd bij één plant een lichtgroene verkleuring van de nervatuur waargenomen. Pas in december 1956 vertoonde deze en een tweede van de drie geïnoculeerde luzerneplanten verschijnselen, die geheel geleken op de hierboven beschreven symptomen van geelnervigheid.

In september 1956 werden virusvrije erwtebladluizen geplaatst op bovengenoemde luzerneplant met zwakke nerfverkleuring. Vervolgens werden zij overgebracht op jonge, gezonde erwteplanten van het ras Unica (vier tot tien luizen per plant). Van de vijf in deze proef gebruikte erwteplanten, waren er na enige weken twee vergelingsziek.

Van een der geelnervige luzerneplanten werden verscheidene stekken genomen, die tot beworteling werden gebracht. Aldus kon het materiaal op eenvoudige wijze voor verder onderzoek in stand worden gehouden.

In mei 1957 werd opnieuw getracht het topvergelingsvirus met erwtebladluizen uit de geelnervige luzernekloon op erwteplanten (ras Unica) over te brengen. Ook thans werd een positief resultaat verkregen: van de 20 planten werden er 11 ziek.

Een derde proef werd genomen in augustus 1957. De erwtebladluizen zogen enige dagen op de geelnervige luzerne en werden vervolgens op vier erwteplanten overgebracht. Deze planten reageerden alle met topvergeling.

Uit deze proeven kan worden geconcludeerd, dat het topvergelingsvirus met behulp van *Acyrthosiphon pisum* van erwt op luzerne kan worden overgebracht en vandaar weer op erwt. Aangezien bij geen van de in de loop der jaren in de kas uit zaad opgekweekte luzerneplanten ooit verschijnselen van geelnervigheid werden waargenomen, behalve bij de met topvergelingsvirus besmette planten, kan worden aangenomen, dat geelnervigheid een gevolg is van infectie met topvergelingsvirus.

Om dit nader aan te tonen werden in het voorjaar van 1957 op Zuid-Beveland en in West-Brabant een zestal monsters luzerneplanten verzameld en op aanwezigheid van het topvergelingsvirus onderzocht. Vijf der betrokken monsters vertoonden geelnervigheid; het zesde had deze verschijnselen niet. Op alle monsters werden virusvrije erwtebladluizen gezet en deze werden enige dagen later overgebracht op gezonde Unica-erwten. Aldus kon uit vier van de vijf monsters met geelnervigheid het topvergelingsvirus worden geïsoleerd. Uit het monster luzerne zonder geelnervigheid brachten de bladluizen geen topvergelingsvirus over.

Hierbij moet worden opgemerkt, dat deze proeven werden bemoeilijkt, doordat de gebruikte stam van de erwtebladluis in de kas op luzerne vaak slechts met moeite tot zuigen kon worden gebracht.

Verder verkregen wij, ook bij het gebruik van bladluizen, die geruime tijd (48 uur of langer) op een topvergelingszieke erwteplant hadden gezogen, bij proefplanten die met 5 tot 10 bladluizen waren bezet, slechts vrij zelden 100 % infectie.

VERSPREIDING VAN GEELNERVIGHEID IN HET VELD

Om te onderzoeken in welke mate het verschijnsel van de geelnervigheid zich in het veld uitbreidt, werd te Wageningen een veldproef genomen (fig. 2). In 1957 waren in drie dubbele rijen luzerne (in fig. 2 gearceerd) planten van de geelnervige luzernekloon geplant en in de loop van het jaar verbreidde de geelnervigheid zich in belangrijke mate van hieruit over de drie rijen. In het voorjaar van 1958 werd de oppervlakte tussen de rijen met luzerne volgezaaid. Bovendien werd ten noorden van de luzernerijen en hierbij aansluitend in regels loodrecht hierop luzerne gezaaid op een oppervlakte van 10 × 21 m. Op drie tijdstippen met tussenperioden van ongeveer 2½ maand, nl. op 7 juni, 26 augustus en 3 november, werden de planten met geelnervigheid in kaart gebracht (fig. 2). Aldus werd een goed beeld verkregen van de verspreiding van het topvergelingsvirus, uitgaande van de besmette rijen.

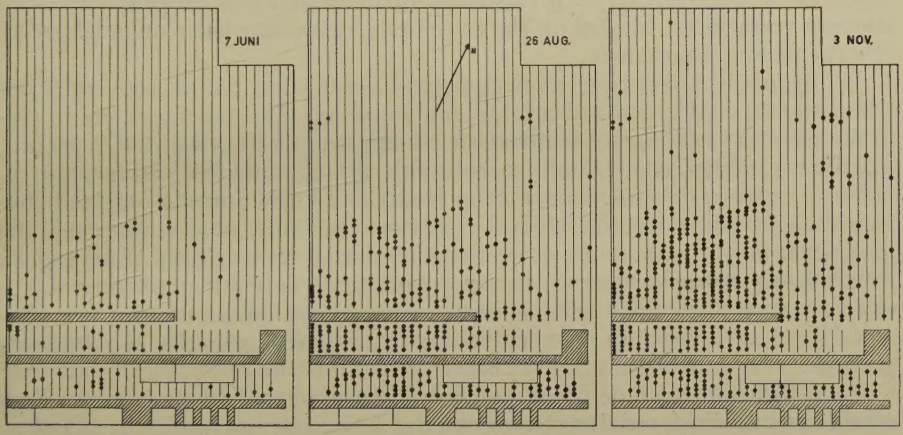


FIG. 2. Natuurlijke verspreiding van geelnervigheid in een luzerneveldje (28½ × 10 m), uitgaande van kunstmatig geïnfecteerde besmettingsstroken (gearceerd). Besmettingsstroken gezaaid en geïnfecteerd in 1957, overige luzerne gezaaid voorjaar 1958. Waarnemingen verricht op 7 juni, 28 augustus en 3 november 1958. (N.B. het veldje is in verhouding 2 × te breed afgebeeld).

Natural spread of vein yellowing in a field of lucerne (28½ × 10 m) from artificially infected rows (shaded). These rows sown and infected in 1957, remaining part of the field sown in spring 1958. Observations 7 June, 28 August, and 3 November, 1958. (N.B. the scale for the length is half that for the width).

Een tweede perceeltje met luzerne van vrijwel gelijke grootte was op ongeveer 100 m ten zuiden van het zojuist beschrevene gelegen, maar had geen besmettingsstroken met topvergelingsvirus. In dit tweede perceeltje werd op 3 november slechts bij één plant geelnervigheid waargenomen.

Aangaande het voorkomen van het geelnervigheidsymptoom in het eerste

proefveld kan worden opgemerkt, dat dit gedurende de zomermaanden steeds duidelijk zichtbaar was. In september 1958, toen veel dagen met zonneschijn en een hoge temperatuur voorkwamen, vormden de zieke planten echter weer normaal groene bladeren. Bij de laatste kartering, eind november, waren de besmette planten weer duidelijk aan de gele nerftekening op de bladeren te herkennen.

BESPREKING

Door QUANTZ & VÖLK (1954) en DE FLUITER & HUBBELING (1955) is de mening geuit, dat luzerne een waardplant van het topvergelingsvirus van de erwt is. De Duitse auteurs grondden dit op het voorkomen in luzernepercelen van planten, „die durch gestauchten Wuchs und chlorotische Aufhellung der etwas versteiften, starren Blättchen auffielen". Het gelukte hen niet, met sap van dergelijke planten een virus over te brengen. Wel vonden zij in de betrokken luzerneplanten een necrose van het floëem, een symptoom, dat zij ook in vergelingszieke erwten hadden waargenomen.

DE FLUITER & HUBBELING concludeerden tot het voorkomen van het topvergelingsvirus in luzerne uit het feit, dat met erwtebladluizen in voorjaar en voorzomer in luzernevelden in het zuidwesten des lands gevangen, gemakkelijk infectie van erwten met topvergelingsvirus tot stand kon worden gebracht. Deze auteurs vermeldden, dat zij in de desbetreffende velden geen duidelijk zieke luzerneplanten waarnamen.

Uit het in dit artikel beschreven onderzoek is gebleken, dat het topvergelingsvirus van de erwt inderdaad luzerne kan aantasten. Dit onderzoek en de verrichte veldwaarnemingen bevestigen de mening van DE FLUITER & HUBBELING, dat luzernevelden in ons land van betekenis zijn als reservoir van het topvergelingsvirus van de erwt. Onder de in Nederland voorkomende omstandigheden verwekt het in luzerne, althans in het ras Du Puits, geen symptomen, die ook maar enigermate op de ziekteverschijnselen in erwt gelijken. Integendeel, een belangrijk deel van het groeiseizoen kunnen de besmette planten er volkomen normaal uitzien. En zelfs in voor- en najaar, als de symptomen van geelnervigheid te voorschijn komen, hebben de besmette planten een normale habitus.

Naar aanleiding van de besproken proeven met de erwtebladluis moet, zoals reeds werd vermeld, worden opgemerkt, dat deze vaak met moeite in de kas op luzerne tot zuigen kan worden gebracht. Het nemen van proeven wordt hierdoor zeer bemoeilijkt. Volgens EVANS & GYRISCO (1956) zou men deze moeilijkheden kunnen verklaren doordat van deze bladluissoort de winterwaardplanten verschillen van de zomerwaardplanten. De migranten verhuizen in het voorjaar van de winterwaardplanten, zoals luzerne, naar de éénjarige zomerwaardplanten, zoals erwten. De zomergeneraties van het insekt zijn volgens deze auteurs ook in de kas doorgaans niet op luzerne te kweken, doordat luzerne dan minder aantrekkelijk voor ze is.

In werkelijkheid is het probleem echter gecompliceerder daar van *Acyrthosiphon pisum* verschillende vormen bestaan, die tot dusver morfologisch niet te onderscheiden zijn, maar b.v. wel verschillen in smaakpreferenties (HILLE RIS LAMBERS, 1947). De gecompliceerdheid blijkt ook uit het feit, dat de geelnervigheid in ons proefveld gedurende de zomer snel werd verspreid (fig. 2) en dat in dit proefveld toen grote aantallen erwtebladluizen konden worden waar-

genomen. Het is evenwel niet uitgesloten, dat ook andere bladluissoorten in de verspreiding een rol hebben gespeeld.

SAMENVATTING

Door middel van de erwtebladluis (*Acyrthosiphon pisum* HARRIS) werd het topvergelingsvirus van de erwt op luzerne (*Medicago sativa* L.) overgebracht. De besmette planten vertoonden na verloop van tijd het verschijnsel van geelnervigheid, te weten een regelmatige, lichtgroene tot gele nerftekening op de bladeren. Dit verschijnsel blijkt veelvuldig in luzernepercelen in het zuidwesten van het land (het gebied waar topvergeling in erwt algemeen voorkomt) op te treden. Het gelukte uit vier van vijf van verschillende plaatsen van West-Brabant en Zuid-Beveland afkomstige monsters geelnervige luzerne het topvergelingsvirus te isoleren.

Uit waarnemingen bij planten, groeiende in het veld en in de kas, is gebleken, dat de omstandigheden een grote invloed hebben op het te voorschijn komen van het ziektebeeld. In het voor- en najaar treedt de geelnervigheid doorgaans zeer duidelijk op; in de zomermaanden verdwijnt dit verschijnsel veelal tijdelijk bij de besmette planten en onderscheiden deze zich niet van virusvrije luzerne.

In een veldproef bleek het topvergelingsvirus, gezien het voorkomen van geelnervigheid in de loop van het seizoen, vrij snel in luzerne verspreid te worden.

SUMMARY

Tip yellows (leaf roll) virus of pea was transmitted to lucerne (*Medicago sativa* L.) by means of the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum* HARRIS). After some months the infected lucerne plants showed a regular lightgreen to yellow discoloration of the veins and the adjacent tissue (fig. 1). No differences in growth and in shape of the leaves between infected and healthy plants were found to exist.

This disease – for which we have chosen the name of „vein yellowing of lucerne" – is very prevalent in lucerne fields in the southwestern part of The Netherlands where tip yellows is often found in peas. We succeeded in isolating tip yellows virus from four out of five samples of lucerne showing vein yellowing collected in western Brabant and Zuid-Beveland.

In carrying out transmission tests, it was found that the pea aphid often hardly sucks on lucerne in the greenhouse. Although it generally is present in large numbers in lucerne fields, it refuses to feed on lucerne after having been reared on peas for a prolonged period. This behaviour of the vector impedes the experiments. It may be due to the fact that the different generations of the insect differ in host plant requirements (EVANS & GYRISCO, 1956) but also to the fact that morphologically indistinguishable forms of the insect exist, which may differ in host plant preferences (HILLE RIS LAMBERS, 1947).

Furthermore, in our experiments seldom a 100 % infection of pea plants was obtained, even when using pea aphids which fed on a tip yellows diseased pea plant for a period of 48 hours or longer, and using five to ten aphids per test plant.

Observations on infected plants growing in the field and in the greenhouse indicate that the environment has great influence on the appearance of the vein yellowing symptom. Generally, vein yellowing occurs very strikingly during the spring-time and the late autumn but disappears in the summer months.

According to observations on the rate of occurrence of vein yellowing at different times of the year in a field experiment at Wageningen (fig. 2), it appears that tip yellows virus is capable of spreading fast in a lucerne field.

The experiments and observations described in the present paper confirm the idea expressed by DE FLUITER & HUBBELING (1955) that lucerne fields are important as a reservoir of the tip yellows virus of pea in The Netherlands.

DANKBETUIGING

Schrijvers willen hier gaarne hun dank uitbrengen aan mejuffrouw H. H. M. STEEGMANS voor het kweken van de bladluizen en aan de heer D. HILLE RIS LAMBERS voor zijn adviezen en de getoonde belangstelling.

LITERATUUR

EVANS, W. G. & G. G. GYRISCO, – 1956. Notes on the biology of the pea aphid. J. econ. Entom. 49: 878–879.

FLUITER, H. J. DE & N. HUBBELING, – 1955. Waarnemingen over topvergeling bij erwten. T. Pl.ziekten. 61: 165–175.

HILLE RIS LAMBERS, D., – 1947. Acyrthosiphon in: Contributions to a monograph of the Aphididae of Europe III. Temminckia 7: 211–264.

QUANTZ, L. & J. VÖLK, – 1954. Die Blattrollkrankheit der Ackerbohne und Erbse, eine neue Viruskrankheit bei Leguminosen. Nachr.-Bl. deutsch. Pfl.-Sch.-D. (Braunschweig) 6: 177–182.

FIG. 1. Bladeren van luzerne (ras Du Puits) met geelnervigheid veroorzaakt door het topvergelingsvirus van de erwt. Links boven, gezond blad.

Leaves of lucerne (variety Du Puits) showing vein yellowing caused by the tip yellows virus of pea. Upper left, healthy leaf.

Aanplant van *Mundulea sericea* in de Cultuurtuin te Bogor, Java, 15 maanden oud en ongeveer 2 meter hoog (1949) (Cliché bruikleen Uitgeverij W. VAN HOEVE, 's-Gravenhage).

Plat of Mundulea sericea *in the Experimental garden of the Agricultural Institute at Bogor, Java, 15 months old and about 2 m high (1949).*

T. Pl.ziekten 65 (1959): 79–88

SAMENSTELLING EN EIGENSCHAPPEN VAN ROTENON-HOUDENDE *MUNDULEA*-BAST[1,2]

With a summary: Composition and properties of rotenone containing Mundulea *bark*

DOOR

W. Spoon en F. E. Loosjes

Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam
en Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen

INLEIDING

Mundulea sericea (Willd.) Chevalier (synoniem *M. suberosa* Benth.) komt voor in tropisch Afrika, op het eiland Madagascar, in India en op Ceylon (Holman, 1940, Meyer, 1947); in latere jaren is dit gewas ook overgebracht naar Indonesië (Toxopeus, 1950). De plant behoort tot de familie der *Leguminosae* en heeft dus o.a. betekenis als groenbemester. Al naar de uiterlijke omstandigheden ontwikkelt de plant zich tot een struik of tot een boom. Op open vlakten (b.v. savannen) blijft de plant struikvormig (verg. de foto), in een gesloten aanplant daarentegen groeit de plant op tot een kleine boom. Zij kan dus als schaduwboom in een aanplant van b.v. koffie worden gebezigd.

Bij de bevolking is bekend, dat de wortels, bast en zaden zeer werkzaam zijn als visvergif. De bestudering van deze werking heeft aangetoond, dat zij berust op de aanwezigheid van rotenon en daaraan verwante z.g. rotenoïde verbindingen. Rotenon-houdende middelen, bereid uit *Derris*-wortel en uit *Lonchocarpus*-wortel, nemen bij de bestrijding van insekten in land- en tuinbouw een bescheiden, maar toch blijvende plaats in vanwege hun betrekkelijke onschadelijkheid voor de mens en hogere dieren, maar tevens vanwege het ontbreken van een giftig residu op de behandelde gewassen. In de meeste landen en ook in ons land is er tussen de bestuiving of bespuiting en de oogst van consumptiegewassen dan ook geen verplichte wachttijd voor deze middelen. Het is jammer, dat deze zeer gunstige eigenschap door de belanghebbenden niet altijd voldoende wordt gewaardeerd; men hecht meestal meer waarde aan de volledige vernietiging van de te bestrijden insekten, zoals de meeste synthetische middelen dat doen. Intussen gaat de moderne overweging, dat men in bepaalde gevallen, als het niet anders kan, slechts de overmaat van de schadelijke insekten met chemische middelen moet opruimen en de rest moet overlaten aan de natuurlijke vijanden, veld winnen. Daarmede valt de aandacht weer meer op misschien wat minder rigoureuze, doch zeker veiliger middelen. Resistentie, opgetreden na vele behandelingen met rotenon, is slechts in enkele gevallen bekend. Zo gezien is uitbreiding van de grondstoffen voor rotenon-houdende produkten dus zeker welkom.

De bast van *Mundulea* kan in veel grotere hoeveelheid worden geoogst dan het zaad en de wortel, zodat het onderzoek zich vooral op de bast heeft gericht.

[1] Aangenomen voor publikatie 23 april 1959.
[2] Tevens Bericht van de afdeling Tropische Producten van het Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, no. 268.

Hierbij is gebleken, dat de bast naast rotenon en aanverwante stoffen ook andere bestanddelen met een giftige werking bevat, waaronder vermoedelijk saponinen de belangrijkste zijn. Door de ontvangst van voldoende bastmateriaal waren wij in de gelegenheid zelf onderzoek te doen, zowel over de samenstelling als over de biologische werkzaamheid (SPOON, 1958).

MATERIAAL EN METHODEN

Voor ons onderzoek beschikten wij over materiaal van Java (Indonesië) en uit Nigeria (West-Afrika).

Java. Dit materiaal was afkomstig uit een koffie-aanplant in Oost-Java, die was opgezet met *Mundulea* als hulpschaduw. Na enige jaren moest deze worden uitgedund, waarbij de drie tot vier jaren oude boompjes werden verwijderd. Hiervan werd de bast van takken en stam afzonderlijk verzameld en na droging opgezonden; het hout werd als brandhout verwerkt.

Wij ontvingen de bast in de vorm van opgerolde reepjes. De takbast (T.P.[1] no. 2668-1) was gemiddeld 0,65 mm dik, de stambast (T.P. no. 2668-2) was gemiddeld 1,1 mm dik; de lengte der bastrepen bedroeg bij de takbast ongeveer 20 cm, bij de stambast 30 cm. De bast, zowel van tak als van stam, was glad en zonder een opvallende kurklaag.

Nigeria. Dit materiaal ontvingen wij door bemiddeling van Dr. Ir. K. EBES, die verbonden was geweest aan het University College te Ibadan. Het was afkomstig uit een der proeftuinen en genomen van ongeveer vier jaar oude boompjes, die 15 cm (6 inch) boven de grond op „stump" waren gekapt. De bast van takken en stam was door elkaar gedroogd en vermalen, het poeder was in blik verzonden (T.P. no. 2769). Het begin van de regentijd wordt het gunstigste tijdstip voor de oogst genoemd: de boom vormt dan nieuwe uitlopers en het cambium is actief, waardoor de bast gemakkelijk kan worden geoogst. De „stump" of stronk loopt weldra uit en na twee tot drie jaar heeft deze zich volledig hersteld tot een nieuw boompje. Medegedeeld werd, dat de bast uit deze aanplant ruw van oppervlak is met een uitgesproken kurklaag.

Bij het vermalen van de bastreepjes met een molen met slagkruissysteem bleek het noodzakelijk het toerental zeer hoog op te voeren, om de voor rotenonhoudende spuit- en stuifpoeders verlangde fijnheid te verkrijgen (Bestrijdingsmiddelenbesluit, 1948). Het verliep dus minder gemakkelijk dan bij *Derris*- en *Lonchocarpus*-wortel. Het University College deelde ons mede, dat men in Nigeria de bast eerst in de zon droogt, daarna verkleint tot stukjes van $\frac{1}{2}$ tot 1 inch (ongeveer 2 cm gemiddeld) en die vervolgens in een oven bij 60° C droogt tot ze knappend aanvoelen, in welke toestand ze zich goed laten vermalen. Toch moesten wij constateren, dat het ontvangen poeder nog te grof was en nogmaals gemalen moest worden om tot de verlangde graad van fijnheid te geraken.

Overigens lijkt ons het drogen van rotenon-houdende grondstoffen bij 60° C bezwaarlijk. Zo is bekend, dat bij het kunstmatig drogen van *Derris*-wortel de temperatuur niet boven 50° C mag stijgen, omdat anders gevaar bestaat op verlies van werkzame bestanddelen (KOOLHAAS, 1935).

[1] T.P. = tropische produkten.

Poeders van de voorgeschreven fijnheid blijken een volumegewicht te hebben van 0,48. *Mundulea*-bastpoeder is dus nog vrij wat lichter dan *Derris*- of *Lonchocarpus*-wortelpoeder, waarvan het volumegewicht gemiddeld 0,56 bedraagt.

SCHEIKUNDIG ONDERZOEK

Bij het scheikundig onderzoek bleek de methode, in gebruik voor het onderzoek van *Derris*- en *Lonchocarpus*-poeder, de beste resultaten te geven (ROWAAN & SESSELER, 1941). Deze omvat extractie met chloroform (of ether), overbrenging van het extract in tetrachloorkoolstof en afscheiding van rotenon als de tetrachloorkoolstof-verbinding. Eventueel kan het zo verkregen ruwe rotenon nog met ethanol in zuiver rotenon worden omgezet.

In tabel 1 hebben wij de analyses van onze *Mundulea*-monsters bijeengebracht. Er blijken verschillen te zijn tussen de monsters van Java en het monster van Nigeria. In de Java-monsters is rotenon te bepalen, bij het Nigeria-monster vindt geen afscheiding van rotenon plaats. Aan de andere kant levert het Nigeria-poeder een veel hoger extract op dan het Java-materiaal. Dit laatste brengt het tot gemiddeld 4 % extract, of berekend op de watervrije stof 4,4 % tegenover 9,5 % bij het Nigeria-materiaal. Het extract van het Java-materiaal bestaat voor de helft uit onzuiver rotenon; na zuiveren bedraagt dit iets minder dan een vierde deel van het extract.

TABEL 1. Samenstelling van *Mundulea*-bast in %
Composition of Mundulea *bark*

T.P. no. / Omschrijving	2668-1b Java, tak-bast/ *bark of branches*	2668-2a Java, stam-bast/ *bark of stem*	2769a Nigeria, bastpoeder/ *powdered bark*	*T.P. no.* / *Description*
vocht	9,2	8,9	5,9	*moisture*
extract	4,1	3,9	8,9	*total extracts*
rotenon, ruw	2,2	1,8	–	*rotenone, crude*
in % v.h. extract	53	47	–	*in % of the extract*
rotenon, zuiver	1,0	0,8	–	*rotenone, pure*
in % v.h. extract	24	21	–	*in % of the extract*
as	3,9	5,1	6,9	*ash*
ruw zand	–	–	0,4	*silica*

BESPREKING VAN HET SCHEIKUNDIG ONDERZOEK

Bovengenoemde verschillen in samenstelling van de bast zijn ook in de literatuur beschreven en onwillekeurig brengt men deze in verband met het karakter van de bast, d.w.z. glad dan wel met een duidelijke kurklaag. Toen we deze kwestie met Dr. EBES bespraken, kon deze ons uit zijn ervaring in Nigeria en ter toelichting van het door het University College gezonden materiaal het volgende mededelen. Dit materiaal (T.P. no. 2769) was afkomstig van een zaaisel van een boom uit de buurt van Ibadan, die een uitgesproken kurklaag aan de voet van de stam had ontwikkeld. Dit type heeft zich o.a. in de savanne van Noord-Nigeria ontwikkeld en is gekenmerkt door een dikke kurklaag aan de voet van de stam, die geleidelijk afneemt tot circa 60 cm hoogte; de bast van de rest van de stam en takken is glad. Daarentegen komt in Oost-Afrika een type voor met

een geheel gladde bast, waarvan materiaal op Java is ingevoerd. Dr. EBES is dan ook van mening, dat het hier gaat om twee variëteiten of twee ondersoorten van *Mundulea sericea* en dat de synoniemen, door ons in de inleiding vermeld, nl. *sericea* en *suberosa*, wel overeenstemmen wat de kenmerken van bloem en blad betreft, maar niet met de verdere eigenschappen, in dit geval het karakter en de samenstelling van de bast. Immers, „*sericea*" betekent zijdeachtig en „*suberosa*" betekent kurkachtig. De variëteit of ondersoort met gladde bast behoort dan als *M. sericea* aangeduid te worden, die met een uitgesproken kurkhoudende bast als *M. sericea* variëteit *suberosa*.

Verschillen in gehalten aan extract en rotenon zoals gevonden zijn tussen de gladde en kurkhoudende *Mundulea*-bast, zijn ook van de *Derris*-wortel bekend (SPOON & TOXOPEUS, 1950). Maar hier betreft het twee botanische soorten, nl. *Derris elliptica* en *D. malaccensis*, waarvan de wortels soortgelijke verschillen bij de analyse opleveren als nu bij de twee typen *Mundulea*-bast werd geconstateerd. Dit bevestigt, dat ook de verschillen bij *Mundulea* kunnen samenhangen met het bestaan van twee variëteiten of typen binnen de soort of mogelijk zelfs van twee soorten. De handel gebruikt het rotenongehalte en niet het extract-gehalte als maatstaf voor de waardering. Passen wij dit toe op de onderzochte typen van *Mundulea*-bast, dan zou slechts de gladde bast in aanmerking komen voor gebruik als bestrijdingsmiddel.

BIOLOGISCH ONDERZOEK

Om na te gaan in hoeverre de bovenvermelde vergelijking op zou gaan, zijn in het Insekticiden-laboratorium van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen enige biologische waarnemingen verricht.

Als vergelijking is uit de verzamelingen van het Instituut voor de Tropen een monster *Derris*-poeder (T.P. no. 2701–2) gekozen met de volgende samenstelling:

vocht/*moisture*	9,7 %
extract	19,4 %
rotenon, ruw/*crude*	7,2 %
rotenon, zuiver/*pure* . . .	6,2 %

Met dit poeder en met de beide *Mundulea*-poeders van Java zijn op basis van het luchtdroge gehalte aan zuiver rotenon enkele stuifmengsels met talk bereid (zie tabel 2).

TABEL 2. Samenstelling van stuifmengsels van *Mundulea*-poeders en *Derris*-poeder met talk
Composition of dusting mixtures of Mundulea *powders and* Derris *powder with talcum*

T.P. no.	2668–1b	2668–2a	2701–2
Omschrijving	*M.*, takbast	*M.*, stambast	*D.*, wortel
Description	M., *bark of branches*	M., *bark of stem*	D., *root*
rotenon 1,– %	onverdund *undiluted*	onverdund *undiluted*	1 op 5
0,5 %	1 op 1	1 op 0,6	1 op 11
0,25%	1 op 3	1 op 2,2	1 op 23
0,12%	1 op 7	1 op 5,4	1 op 47

Als gevolg van het hogere rotenon-gehalte van het *Derris*-poeder (6,2 %) moest dit veel sterker worden verdund dan de beide *Mundulea*-poeders, met als gevolg dat het aantal actieve deeltjes in de *Derris*-stuifmengsels bij opklimmende verdunning vrij sterk achter bleef vergeleken bij de *Mundulea*-mengsels. Verder maakte het zeer lichte karakter van het *Mundulea*-poeder dat dit vooral bij het stuiven in onverdunde toestand langer bleef zweven dan de sterk talkhoudende mengsels. Met deze onvolkomenheden moet bij de beoordeling van de resultaten rekening worden gehouden.

Het monster uit Nigeria, waarin geen rotenon kon worden aangetoond, is vergeleken met het monster *Derris*-poeder op basis van het extract met chloroform. Op voorstel van Dr. Ebes is het Nigeria-poeder eerst scherp afgezeefd (200 mesh) teneinde een verbetering in het gehalte te bereiken. Inderdaad steeg dit tot 13,5 % in het luchtdroge poeder. Tabel 3 geeft de grondslag voor een vergelijking van beide poeders te zien.

Tabel 3. Vergelijking van „Nigeria"- en *Derris*-poeder op basis van extract
Comparison of „Nigeria"- and Derris *powder on base of extract*

T.P. no. *Sample no.*	Omschrijving *Description*	Vocht *Moisture*	Extract	Extract op droge stof *Extract on the dry base*
2769–1a	Nigeria-poeder	6,0%	13,5%	14,4%
2701–2	Derris-poeder	9,7%	19,4%	21,5%

Volgens de laatste kolom van tabel 3 is dus de verhouding van het extractgehalte in beide poeders, berekend op droge stof, 2 tot 3, de verdunningstabel kan dan ook luiden als vermeld in tabel 4.

Tabel 4. Verdunning van „Nigeria"-bast en *Derris*-wortel
Dilution of „Nigeria" bark and Derris *root*

T.P. no. . . . . Omschrijving . . . . . *Description*	2769–1a „Nigeria"-bast *„Nigeria" bark*	2701–2 Derris-wortel *Derris root*
extract: 14,4%	onverdund	2 op 1
7,2%	1 op 1	1 op 2

De verdunningen bij het Nigeria-monster behoefden dus veel minder ver te gaan dan bij de Java-monsters.

Met de op deze wijze verdunde monsters zijn de volgende proeven uitgevoerd.

In de eerste plaats werden graanklanders (*Calandra granaria* L.), bonekevers (*Acanthoscelides obtectus* Say) en *Tribolium castaneum* Hbst. bestoven door middel van de laboratorium-stuifapparatuur (Loosjes, 1956). De dieren werden na de behandeling in schone schalen overgezet. Het bleek, dat met normale doseringen (22,5 en 30 kg/ha) op deze wijze geen doding van betekenis bij deze soorten kon worden bereikt.

Betere resultaten werden verkregen met jonge ringelrupsen (*Malacosoma neustria* L.) van ca. 6 mm lang. Iedere verdunning werd in vijfvoud verstoven

op totaal 250 rupsjes. Per bestuiving werd 150 mg poedermengsel gebruikt (22,5 kg/ha); de dieren bleven in de bestoven petrischalen. Zie tabel 5A.

TABEL 5. Mortaliteit in %, na 4 en 7 dagen, van jonge ringelrupsen (*Malacosoma neustria* L.) van ca 6 mm lengte in laboratoriumproeven, waarbij iedere verdunning in vijfvoud werd verstoven op totaal 250 dieren, welke zich in petrischalen bevonden.

Mortality in % after 4 and 7 days in experiments with young larvae of Malacosoma neustria L., *average length 6 mm, each dilution dusted in five fold on 250 larvae in petri-dishes.*

	Verstoven doses in kg per ha *Dosage in kg per ha*	Perc. rotenon of extract (e) *Perc. rotenone or extract (e)*	*Mundulea* takbast *bark of branches*		*Mundulea* stambast *bark of stem*		„Nigeria" bast *bark*		*Derris*-wortel *root*	
			4 d.	7 d.	4 d.	7 d.	4 d.	7 d.	4 d.	7 d.
A. De rupsjes bleven na de behandeling in de bestoven schalen. *The caterpillars remaining in the dishes*	22,5	1	42	91	68	96			88	100
		0,5	58	97	88	100			33	94
		0,25	52	97	73	99			42	88
		0,12	32	92	56	91			22	72
B. De rupsjes na de behandeling in schone schalen gezet. *The caterpillars after dusting transferred to clean dishes*	22,5	1	12	38	6	16			38	91
		0,5	40	77	38	86			8	40
		0,25	20	54	26	42			6	16
		0,12	4	22	8	26			8	20
C. De rupsjes na de behandeling in schone schalen gezet. *The caterpillars after dusting transferred to clean dishes*	30	1	23	100	44	95			91	100
		0,5	72	99	58	100			65	100
		0,25	36	97	66	100			22	90
		0,12	15	78	28	81			–	45
D. De rupsjes bleven na de behandeling in de bestoven schalen. *The caterpillars remaining in the dishes.*	22,5	14,4 (e)					2	24	98	100
		7,2 (e)					7	30	93	100
E. De rupsjes na de behandeling in schone schalen gezet. *The caterpillars after dusting transferred to clean dishes*	30	14,4 (e)					7	32	100	100
		7,2 (e)					8	15	90	100
F. De rupsjes bleven na de behandeling in de bestoven schalen. *The caterpillars remaining in the dishes.*	30	4 (e)	59	98	84	99	12	40	85	100
		2 (e)	84	100	88	100	3	4	64	98

– = geen waarneming *no observation*

De naar verhouding geringe doding bij de *Mundulea*-poeders met 1 % rotenon menen wij toe te moeten schrijven aan het langere zweven van deze zeer lichte

poeders in onvermengde toestand. Alleen indien de bezinkingstijd zeer ruim genomen zou worden, zou mogelijk een beter resultaat worden bereikt, doch zeer lichte poeders bereiken in de praktijk hun doel meestal ook slechts zeer gedeeltelijk. Wij vergelijken in de tabel dus liever de lagere rotenon-percentages, waarbij overigens de zeer grote verdunningen van het *Derris*-poeder weer ongunstig op een vergelijking zouden kunnen werken. Bij de controle na 4 dagen blijkt *Mundulea*-stambast het beste resultaat te geven, dan komt *Mundulea*-takbast en ten slotte *Derris*-poeder. Na zeven dagen is het resultaat van de beide *Mundulea*-monsters vrijwel gelijk en wat gunstiger dan van het *Derris*-monster. Men zou zeggen, dat *Mundulea*-stambast hier wat sneller werkte dan de takbast.

Op gelijke wijze werden nog enige proeven met jonge ringelrupsen uitgevoerd, waarbij echter de dieren na de bestuiving steeds op voedsel (meidoornblad) in onbehandelde schalen of potten zijn overgezet. Zie tabel 5B.

Behoudens het feit, dat stambast en takbast ook na vier dagen ongeveer even werkzaam zijn, komen de resultaten met die van de vorige proef overeen. De doding is over de gehele proef lager, waarschijnlijk door de minder lange duur van het contact.

Wij hebben daarom nog eens gestoven met 200 mg poedermengsel per bestuiving (30 kg/ha), terwijl wederom de rupsjes na de behandeling werden overgezet. Zie tabel 5C.

In deze proef worden dus de reeds gevonden gegevens bevestigd.

Een herhaling gaf nog eens hetzelfde beeld; steeds geven de *Mundulea*-monsters de beste resultaten en meestal is het *Mundulea*-stambast monster het beste.

Het monster uit Nigeria werd op gelijke wijze verstoven, met 150 mg poeder in het stuifapparaat (22,5 kg/ha), terwijl de dieren in de bestoven schalen bleven. Voor de resultaten zie tabel 5D.

Het verschil met het *Derris*-monster is duidelijk.

Een herhaling met 200 mg (30 kg/ha) doch overzetten van de rupsjes na de behandeling, gaf het resultaat dat vermeld is in tabel 5E.

Het „Nigeria"-monster blijft dus duidelijk bij het *Derris*-monster in werkzaamheid achter.

Tot slot van deze serie stuifproeven hebben wij alle vier monsters, verdund met talk op basis van extractgehalte, op jonge ringelrupsen verstoven (200 mg), de dieren bleven in de bestoven schalen. De resultaten zijn vermeld in tabel 5F.

Deze resultaten laten zien dat ook nu weer de onverdunde *Mundulea*-tak- en stambast minder resultaat geeft dan de met talk verdunde. Ook werd weer het beste resultaat bereikt met deze *Mundulea*-typen, daarna volgt *Derris*-wortel. Dit is interessant omdat ditmaal de verdunning niet groot is, zodat daarin geen reden tot mindere werkzaamheid kan schuilen. De Nigeria-bast is wederom zeer weinig werkzaam. Het is dus wel duidelijk het rotenongehalte, dat voor een goede werkzaamheid van primair belang is.

Bij de beoordeling van tabel 5 dient men er rekening mede te houden, dat de proeven A, B, C, enz. op verschillende dagen werden genomen, onder andere omstandigheden wat temperatuur en vochtigheid betreft, zodat alleen vergelijking van de conclusies mogelijk is. Vergelijking van de afzonderlijke dodingspercentages van A en B, enz. moet daarom met de nodige voorzichtigheid geschieden.

Naast deze stuifproeven hebben wij een proef uitgevoerd, waarbij 500, 1000 en 2000 mg poedermengsel met 250 g tarwe werd gemengd (2, 4 en 8 g/kg) en deze tarwe daarna besmet werd met 100 graanklanders. Elk mengsel werd in tweevoud beproefd (experiment with 100 *Calandra granaria* on 250 g wheat mixed with 500, 1000 and 2000 mg *Mundulea* powder, i.e. 2, 4 and 8 g/kg). Zie tabel 6.

Tabel 6. Mortaliteit in % na 2 en 4 weken
Mortality in % after 2 and 4 weeks

omschrijving *description*	*Mundulea*-takbast M., *bark of branches*						*Mundulea*-stambast M., *bark of stem*						*Derris*-wortel D., *root*					
rotenon	500 mg		1000 mg		2000 mg		500 mg		1000 mg		2000 mg		500 mg		1000 mg		2000 mg	
	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w
1 %	31	34	39	46	23	38	19	25	18	28	25	40	53	74	65	86	76	98
0,5 %	20	24	13	16	27	36	16	21	13	22	21	32	24	29	46	65	40	84
0,25%	12	13	16	23	11	19	16	17	20	25	21	32	13	23	19	32	23	43
0,12%	7	11	9	17	9	15	8	9	12	13	18	24	12	17	10	17	24	38

Op deze wijze op graanklanders toegepast, blijkt *Derris*-wortel dus het meeste werkzaam te zijn; de *Mundulea*-monsters blijven beide ongeveer evenveel in werkzaamheid achter.

BESPREKING VAN HET BIOLOGISCH ONDERZOEK

Uit bovenstaande proeven blijkt:

1. dat bij verstuiven op jonge ringelrupsen de verdunde, rotenonhoudende *Mundulea*-stam- en -takbastmonsters duidelijk werkzamer zijn dan een *Derris*-wortelmonster met gelijk rotenon- of extract-gehalte;
2. dat het *Mundulea*-monster uit Nigeria dat geen rotenon bevat zeer weinig werkzaam is;
3. dat bij menging van de onverdunde rotenon-houdende *Mundulea*-stam- en takbastmonsters met tarwe een duidelijk minder sterke werking ten opzichte van daarop gehouden graanklanders blijkt dan bij menging van tarwe met een *Derris*-wortel-poeder met overeenkomend rotenongehalte.

In aansluiting hierop kunnen wij vermelden, dat het University College in Nigeria *Mundulea*-poeder tegen de volgende plagen gebruikt. Ter bestrijding van klander (*Calandra*) in opgeslagen partijen graan worden deze met het poeder vermengd in de verhouding van 12 oz. per 50 lb. graan of 16 g per kg graan. De zgn. „neutral dusts" (inerte poeders) tegen voorraad-insekten in granen gaan uit van een dosering van 6 oz. per 200 lb. of 2 g per kg graan. Dit is heel wat

minder en wijst niet op een bijzondere biologische werkzaamheid van het „Nigeria"-poeder, het betreft dan ook volgens onze waarnemingen een *Mundulea*-poeder waarin rotenon niet is aan te tonen. Voorts wordt het poeder gebruikt tegen muskietelarven door het poeder in de verhouding van 10 g per l op water uit te strooien, met volledig resultaat binnen 18 uren.

CONCLUSIE

Toekomst zit dus in de bast van die variëteit of ondersoort van *Mundulea sericea*, waarin rotenon aanwezig is en die vermoedelijk gekenmerkt is door afwezigheid van een uitgesproken kurklaag; bij het opzetten van cultuurproeven dient in de eerste plaats met dit kenmerk rekening te worden gehouden.

SUMMARY

Mundulea sericea occurs in tropical Africa, on Madagascar and in India and has also been brought to Ceylon and Indonesia. *Mundulea*, like *Derris* and *Lonchocarpus*, belongs to the family of the *Leguminosae*, so these three genera are closely related.

Dependent on outward circumstances the plant develops into a shrub or into a small tree (compare the photograph). The bark is the valuable part of the plant as it possesses insecticidal properties, which are based on the presence of rotenone or rotenoidal compounds in general. Besides these, *Mundulea* bark also contains saponine, which is a disadvantage compared with *Derris* and *Lonchocarpus* root, for saponines are not harmless to man. On the other hand, because of their foamforming ability, the saponines can further the distribution of the powder in water for spraying purposes.

The bark can be harvested by stumping trees which are three to four years old, and removing the bark from stem and branches. The stump soon sprouts and after two to three years a new tree has developed.

We received samples of the bark from Java and from Nigeria. The samples differed in appearance; the bark from Java was smooth, that from Nigeria was distinctly corky. Examination in the laboratory showed further differences between both samples; in the bark from Nigeria no or nearly no rotenone could be found, whereas in the bark from Java its presence could easily be proved (compare table 1). This difference as regards the presence of rotenone also exists between *Derris elliptica* and *D. malaccensis*.

After grinding thoroughly, both samples of bark were compared with a sample of *Derris* powder, the composition of which was known. Biological tests were made with *Calandra granaria*, *Acanthoscelides obtectus*, *Tribolium castaneum* and *Malacosoma neustria* by means of dusting, and in the case of *Calandra* also by mixing the powder with wheat. *Mundulea* powder is lighter than *Derris* powder, the weight per volume is 0.48 against 0.56. In dusting this may have some influence on the results; when mixed with a heavy filler, preferably talcum, the results will be better comparable.

Table 5 shows that the powdered bark from Nigeria had only a weak effect, but that the bark from Java (the type which contains rotenone) was even more effective than the *Derris* powder, when used as a dust on caterpillars. By mixing with wheat the effect was distinctly less. Still, this is one of the principal uses of *Mundulea* bark in Nigeria.

Bestrijdingsmiddelenbesluit 1948 en Versl. & Meded. Plantenz.k. dienst 110: 16.
Holman, H. J., – 1940. A survey of insecticide materials of vegetable origin. London: 91–93 (met literatuurverwijzingen).
Koolhaas, D. R., – 1935. Het drogen van Derriswortels. Bergcultures 9: 625–627 en Alg. Landb. Weekblad Ned. Indië 20: 26–28.
Loosjes, F. E., – 1956. Laboratorium stuifapparatuur. Versl. & Meded. Plantenz.k. dienst 127: 200–204.
Meyer, Th. M., – 1947. Chemical constituents of Mundulea suberosa Benth., part I. Recueil trav. chim. Pays-Bas 66: 177–183 (met literatuurverwijzingen).
Rowaan, P. A. & Wa. M. Sesseler, – 1941. Rotenonbepaling in Derriswortel. Chem. Weekblad 38: 744–745.
Spoon, W. & H. J. Toxopeus, – 1950. Derriswortel, in De landbouw in de Indische archipel. 's-Gravenhage, deel III: 578–608.
Spoon, W., – 1958. Mundulea-poeder, een rotenonhoudend insekticide. Meded. Landbouwhogeschool en Opzoekingsstations v.d. Staat te Gent 23: 918–920 (voorlopige mededeling Tiende Internationaal Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie).
Toxopeus, H. J., – 1950. Enige nieuwe cultuurgewassen: Mundulea sericea, in De landbouw in de Indische archipel, 's-Gravenhage, deel III: 724–726 (hieraan is de illustratie ontleend).

T. Pl.ziekten 65 (1959): 89–106

INVESTIGATIONS ON WHITE CLOVER MOSAIC VIRUS[1]

Met een samenvatting:

Onderzoekingen over witte-klavermozaïekvirus

BY

L. Bos, B. Delević[2] and J. P. H. van der Want[3]

Institute of Phytopathological Research, Wageningen, The Netherlands

INTRODUCTION

In studying virus diseases of leguminous plants (van der Want & Bos, 1958; Bos & van der Want, 1958) we several times isolated a virus from white clover and other plants such as peas, which differed in many respects from other well-known legume viruses. This virus, designated here as white clover mosaic virus, has already been studied by van der Want (1954). However, many of its properties and much of its behaviour remained unknown.

Recently, one of the authors made a study of a virus isolate which was assumed to be common pea mosaic virus. It turned out to be a complex of viruses, white clover mosaic virus being one of them.

Since white clover mosaic virus was isolated several times from red and white clover plants from different localities in The Netherlands, and once from pea, a more detailed study of the virus was made. Although exact data on its incidence are still not available, the present paper will give an account of the results of this study.

Special attention was paid to a comparison of the Dutch virus with the American white clover mosaic virus (*Trifolium virus* 1 Zaumeyer & Wade), which has been reported to be of complex nature (Johnson, 1942).

LITERATURE REVIEW

In 1947 van der Want (1954) isolated a virus from mosaic diseased white clover. Then in 1953, during his stay at Wageningen, Oswald examined white clover plants for the presence of alfalfa mosaic virus. He isolated a virus differing from the former in not being infective to tobacco and in causing a faint systemic mosaic on beans after some initial necrosis on the inoculated leaves. This virus was presumed to be a strain of the bean yellow mosaic virus. In his studies on the bean viruses 1 and 2 van der Want (1954), however, was able to demonstrate clearly that the isolates obtained in 1947 and in 1953 differed from the bean yellow mosaic virus symptomatologically, serologically and on the basis of their morphology as studied in the electron microscope. He was the first to publish a picture of the virus particles.

Since 1935 a mosaic disease of white clover has been known in the American literature (Zaumeyer & Wade, 1935, 1936; Pierce, 1935). Weiss (1939)

[1] Accepted for publication 26 February, 1959.

[2] Present address: Institute for Phytopathology, Agricultural Faculty of University Beograd, Yugoslavia.

[3] Present address: Laboratory of Flowerbulb Research, Lisse.

designated the virus as *Trifolium virus* 1 ZAUMEYER & WADE. This virus has many features in common with the Dutch isolates (VAN DER WANT, 1954). JOHNSON (1942) claimed this American virus to be of complex nature, consisting of two components, viz. "pea wilt" virus and "pea mottle" virus. These two differed slightly in symptoms, and very little in physical properties. The wilt virus could be isolated by means of inoculating the complex to cowpea (*Vigna sinensis* ENDL.) only being susceptible to the pea wilt virus. The mottle virus could be separated by means of transmission by dodder (*Cuscuta campestris* YUNCKER). This component could infect also *Antirrhinum majus* L., *Cucumis sativus* L., *Spinacia oleracea* L. and *Stellaria media* (L.) CYRILL., whereas the wilt virus was restricted to leguminous plants.

From his preliminary trials VAN DER WANT (1954) got the opinion that the Dutch isolates were not of complex nature, but nevertheless belonged to the same virus group formerly designated *Trifolium virus* 1.

Recently in Germany also QUANTZ (1956) isolated a virus from naturally infected white clover, *Medicago lupulina* and *Trifolium hybridum*, which induced symptoms in *Phaseolus vulgaris* and possessed physical properties typical for the white clover mosaic virus. QUANTZ supposed this virus to be related to the above mentioned pea wilt virus. BRANDES & QUANTZ (1957) studied the virus in the electron microscope. Morphologically their isolate was similar to the isolate of VAN DER WANT (1954). The estimated standard length of the virus was 476 mμ according to BRANDES & QUANTZ (1957).

MATERIALS AND METHODS

Four isolates of the white clover virus from different sources were studied viz.

1. WKV, isolated from white clover (isolate of VAN DER WANT, 1954),
2. ER, isolated from peas, showing necrosis; collected in 1956,
3. TRV, isolated in 1956 from red clover showing mosaic,
4. DEL, isolated in 1957 from peas with a complex of the virus together with the common pea mosaic virus. The white clover virus manifested itself by inducing a heavy wilting of infected peas in greenhouse studies during autumn when the light was very poor.

The experiments were carried out in greenhouses especially designed for virus research; those with isolate DEL, partly in a normal insect-proof greenhouse which was often fumigated. Temperatures varied from 18–23° C. The plants were grown in sterilized compost soil contained in 4 or 6 inch clay pots.

Test plants used to study the host range were infected by means of sap inoculation using carborundum as an abrasive. Susceptibility was proved by means of symptom expression, back inoculation to susceptible beans and peas, and by examination with the electron microscope.

Dodder transmission experiments were carried out with *Cuscuta campestris* YUNCKER. The parasite was grown on diseased broadbean and pea plants. After 18 days exposure to these plants dodder branches 10–20 cm long, were collected and divided into two groups, 1– to be transferred to healthy test plants and 2 – to be tested directly for presence of the virus by means of rubbing the expressed sap onto leaves of healthy *Phaseolus vulgaris*.

In the insect transmission tests *Acyrthosiphon pisum* HARRIS, *Aphis fabae*

SCOP. and *Myzus persicae* SULZ. were used. After a starvation period of one to three hours the aphids fed on peas infected with the isolate WKV for periods indicated. Then they were immediately transferred to healthy pea test plants. For each treatment, two pots containing four plants each, were tested using 20 aphids per pot. After two days, or sometimes longer, the aphids were killed by an insecticide. In another experiment the insects were observed individually during the infection feeding period and the length of this period was controlled by means of a stopwatch.

The thermal inactivation point determinations were made by placing 2 ml of freshly extracted juice of Beka beans in thin walled test tubes and immersing these in a heated water bath. Temperatures in the water bath were controlled and maintained at the desired level. After 10 minutes the tubes were rapidly cooled in tap water. Then inoculations were made. Distilled water was used in performing the dilution tests. For the ageing tests, expressed sap of Beka beans was placed in stoppered bottles on the laboratory table. At irregular intervals inoculations were made on susceptible hosts.

Various tests were repeated several times.

For preparing the electron micrographs about 50 mg of infected plant material was ground in a mortar together with 2.5 ml of distilled water. The sap thus obtained at a dilution of about 1:50, and also diluted 1:100, was atomized onto the grids covered with a thin layer of collodion by using a pyrex nebulizer. The grids were then shadow cast with palladium and viewed with a Philips electron microscope at the Physico-Technical Service for Agriculture at Wageningen by Miss C. VAN DER SCHEER and Mr. S. HENSTRA.

In the serology tests use was made of antiserum 1.4.15 prepared in 1951 against an isolate no longer available and antiserum 7.5.40 prepared in 1958 against the isolate DEL.

Antiserum 1.4.15 was prepared by injecting a rabbit in the ear with dialysed sap of diseased broad beans. Injections were performed four consecutive days and after an interval of three days two other days. Quantities varying from 1 to 6 ml were used. The blood was taken one week after the last injection.

Sap of French bean plants to be used for preparing the antiserum 7.5.40 was purified by centrifuging for 15 min. at 7,000 r.p.m., after which the virus-containing supernatant was concentrated in the ultracentrifuge by means of the density gradient method. The rabbit was injected in the ear for $7\frac{1}{2}$ weeks at irregular intervals for a total of 12 times with quantities of virus containing liquid varying from $1\frac{1}{2}$ to 3 ml. Seven days after the last injection the blood was taken.

Before performing the serological tests, the antisera were saturated by mixing with sap of healthy Beka bean (1:3), incubating the mixture at 37° C for 2 hours, cooling in a refrigerator and subsequently centrifuging at 12,000 r.p.m. for 20 min. The saturated antiserum thus obtained at a dilution 1/4 was further diluted with saline as indicated in table 3.

The sap containing virus was obtained from leaves of infected Beka beans. The leaves were frozen for two days, squeezed, filtered through cheese cloth, the sap thus obtained mixed with saline (1:3), the mixture frozen for three hours and after thawing centrifuged at 10,000 r.p.m. for 20 minutes. Dilutions as indicated in table 3 were made with saline.

The serological tests were performed according to the microreaction method

under paraffin oil developed by VAN SLOGTEREN (1955). Results were read after one hour at 37° C.

EXPERIMENTAL RESULTS

Host range studies

We included cowpea, cucumber, spinach and some other non-leguminous plants in our host range studies to provide a comparison of our virus isolates with those of the American viruses of pea wilt and pea mottle, and also to get information whether or not our virus was of complex nature.

A scheme of the inoculations with the three Dutch isolates performed separately on several host plants and a summary of the results is given in table 1. Generally the results obtained with each of the three isolates were similar. To check the presence of virus and to determine whether differences in symptom expression might be due to the isolation of components, several back inoculations were made. In the first series of inoculations (table 1, first column) the presence of virus was checked also by means of the electron microscope (cf. also electron microscopy).

In peas, French bean, cowpea, red clover, crimson clover and in broad bean infection was evident both on the basis of symptom expression and electron microscopy. In most cases large numbers of particles characteristic of the white clover mosaic virus were present. Generally in white clover it was difficult to see symptoms. However, by means of the electron microscope infection could easily be proven. In all these plants, back inoculations supported these primary results (column 2), being the same for cowpea and the other mentioned plant species. From lucerne without symptoms, back inoculations repeated twice, could not reveal infection or presence of the virus. In a separate trial to test lucerne again as a possible host plant, the same results were obtained.

In spinach (*Spinacia oleracea* L.), *Gomphrena globosa* L. (detached leaves in petri dishes), sweet william (*Dianthus barbatus* L.) and carnation (*D. caryophyllus* L.) we could not detect infection in any way.

In cucumber, no. 10 of the first series of host plants in table 1, we could not prove infection by means of symptoms or the electron microscope. In doing back inoculations to Beka beans and Mansholt peas, virus appeared to be present, symptoms suggesting the inciting agent to be the white clover mosaic virus. Using the sap from this Beka beans we again were able to demonstrate the presence of the white clover mosaic virus by inoculating Beka beans, Mansholt peas, cowpea and broad bean. By using the same sap, in this case all three isolates were infectious to cucumber, inducing numerous small yellow spots on the inoculated cotyledons and definite yellow, diffuse, systemic flecks on the higher leaves (fig. 7). The virus also could be recovered from these cucumber plants in the same way as could be done from the other plants of this series (table 1, last column).

In this way the results obtained with cucumber (no. 10) were the same as those with cowpea (no. 4). Via cowpea, cucumber also could be infected. The only difference observed in the last series of back inoculations (last column) was a delayed appearance of symptoms in the Beka beans and in the Mansholt peas when using the infectious sap from cucumber (no. 10) in comparison with the virus from cowpea (no. 4). Similar results were obtained in a test with isolate WKV from infected cowpea and cucumber inoculated to Mansholt and

Servo peas. This was good evidence that the white clover mosaic virus can pass through cowpea and infect cucumber and vice versa.

The results of host range experiments obtained separately in a slightly different way with the isolate DEL, agreed quite well with those mentioned above. The only difference might be the infection of lucerne with isolate DEL which produced an inconspicuous mottle, being not conclusive, however. Transferring this isolate from cowpea and cucumber to beans and peas as test plants, these gave similar results to those obtained with the other three isolates.

The results of these experiments indicate that the white clover mosaic virus can go to cowpea as well as to cucumber. This is in contrast with the results published by JOHNSON (1942). The fact, that both these plant species can be infected with our isolates, suggests a similarity of our virus with the white clover mosaic virus of JOHNSON as a whole (wilt and mottle components together). That all four isolates of the virus, studied by us, did not go to spinach might be due to a difference in variety of this test plant.

Bean varietal reaction. Eight bean varieties were tested for their reaction to the WKV isolate of the white clover mosaic virus. All varieties were susceptible. These included the dwarfbeans Citroengele and Noordhollandse Bruine, the dwarf French (snap) beans Hinrich's Reuzen, Roem van Holland, and Processor, the pole snap bean Rentegevers zonder draden, the pole bean for slicing Verschoor and the haricot bean Kievitsboon. For the symptoms produced cf. page 96.

Two varieties of runner beans (*Phaseolus coccineus* L.), Emergo and Prijswinner, were tested; both turned out to be immune.

Pea varietal reaction. Twelve pea varieties were tested for their reaction to the WKV isolate of the virus. All varieties were susceptible. These included the varieties Alaska, Big Ben, Erickson Perfection, Eroica, Juweel, Kelvedon Wonder, Koroza, Rondo, Servo, Vares, Venlose Lage and Wyola. Another series of 15 pea varieties tested against the DEL-isolate demonstrated the susceptibility of all these varieties.

Symptomatology

By mechanical inoculation to 14 species of test plants (table 1) the three isolates WKV, ER and TRV were compared on the basis of the symptoms they produced in susceptible plants. They did not differ in host range (p. 92). According to the symptoms produced, they hardly showed differences. On Beka beans TRV had a tendency towards a somewhat longer incubation period. WKV appeared to be the most virulent of the isolates. Isolate DEL was studied in a separate test. The symptoms in various hosts due to the white clover mosaic virus in general will be described here.

1. Pea (*Pisum sativum* L.): About six days after inoculation the inoculated leaves wilt and the younger foliage is epinastic. Generally they also show some vein clearing and afterwards a diffuse mottling consisting of slightly darker or sometimes light, small, yellow spots. About eight days after inoculation the stem shows a grayish discoloration and the sides of the stem are sunken. Affected plants are often stunted, but they may recover to some extent. The wilt often progresses upwards (fig. 1). Then the plants die, sometimes giving rise to new outgrowth of basal branches. These develop the diffuse mottle mentioned

TABLE 1. Scheme of inoculations, back-inoculations and results obtained with the Dutch isolates WKV, ER, and TRV of the white clover mosaic virus.

Schema van inoculaties, teruginoculaties en resultaten verkregen met de Nederlandse isolaties WKV, ER en TRV van het witte-klavermozaïekvirus.

Date of inoculation *Inoculatiedatum*	25/3		8/4		16/5		9/6	
Plants tested *Getoetste planten*	Reaction[1] *Reactie*	EM[2]	Plants tested[4] *Getoetste planten*	Reaction *Reactie*	Plants tested *Getoetste planten*	Reaction *Reactie*	Plants tested *Getoetste planten*	Reaction *Reactie*
1. pea var. Eroïca *erwt var. Eroïca*	+	+	Beka Mansholt	+ +				
2. pea var. Mansholt's Pluk *erwt var. Mansholt's Pluk*	+	+	Beka Mansholt	+ +				
3. bean var. Beka *boon var. Beka*	+	+	Beka Mansholt	+ +				
4. cowpea var. 37 c–6 *Vigna sinensis*	+	+	Beka Mansholt	+ +	Beka Mansholt cowpea (Black eye) cucumber broad bean	+ + ? + +	Beka Mansholt cowpea 37 c–6 cowpea (Black eye)	+ + + ?
5. red clover *rode klaver*	+	+	Beka Mansholt	+ +				
6. white clover *witte klaver*	(+)	+	Beka Mansholt	+ +				
7. crimson clover *inkarnaat klaver*	+	+	Beka Mansholt	+ +				
8. lucerne *luzerne*	—	—	Beka Mansholt	? ?				

	runboon		Mansholt				
					Beka	+	Beka
							Mansholt
					Mansholt	+	cowpea 37 c 6
							cowpea (Black eye)
10.	cucumber *komkommer*		Beka		cowpea (Black eye)	?	Beka
			Mansholt				Mansholt
							cowpea 37 c 6
							cowpea (Black eye)
					cucumber		Beka
					broad bean	?	Mansholt
							cowpea 37 c 6
							cowpea (Black eye)
11.	spinach *spinazie*		Beka	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
			Mansholt	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
12.	Gomphrena globosa	—	Beka	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
			Mansholt	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
13.	sweet william *duizendschoon*		Beka	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
			Mansholt	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
14.	carnation *anjer*	—	Beka	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		
			Mansholt	?	Beka		
					Mansholt		
					red clover		

[1] + symptoms typical for the white clover mosaic virus
symptomen karakteristiek voor het witte-klavermozaïekvirus

— no symptoms
geen symptomen

? symptoms questionable
symptomen onzeker

[2] presence of the virus checked by means of the electron microscope
aanwezigheid van het virus gecontroleerd met de elektronenmicroscoop

[3] detached leaves on moist blotting paper in petri dishes
afgesneden bladeren op vochtig vloeipapier in petrischalen

[4] for convenience only name of variety used
gemakshalve alleen de naam van het ras genoemd

above (fig. 2). All varieties of pea tested were susceptible. There was only a slight difference in symptom expression. The pea varietal reaction test was performed in the greenhouse. Simultaneously a parallel series was placed in a conditioned cabinet with poor light (four T.L. tubes 60 Watt per m^2) and a relatively high temperature (18–20°). In this series all varieties wilted within one or two weeks.

2. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), variety Beka: The first reaction could be observed about six days after inoculation. It consisted of a beginning epinasty of the inoculated primary leaves with often diffuse chlorotic spots of about two to three mm in diameter (fig. 3A) showing a tendency to become necrotic along the edge or in the centre (fig. 3B). Moreover these primary leaves show a local grayish discoloration of the big veins (fig. 3B) and petioles. After some time this could be also observed in the lower part of the stem and incidentally in the petioles of higher leaves. As studied anatomically this discoloration appeared to be due to an irregularly distributed formation of dark brown gum associated with some necrosis in the parenchyma. Especially big groups of cells in the regions between the vascular bundles are filled with gum. To some extent this holds also for the parenchyma between the xylem and in the pericycle, whereas here also more necrosis is apparent. The systemic symptoms, appearing about eight days after inoculation in the trifoliate leaves, consisted of local chlorotic discolorations of the veins and neighbouring interveinal tissue. This symptom is mostly characterized by a local, irregularly bordered clearing of the tiny reticulated veinlets (fig. 4A). It gave these leaves a blotted mosaic-like appearance, varying from regularly scattered small asteroid spots to large, irregularly shaped, local areas with a yellow-green, translucent colour. In the latter case the leaf often was somewhat malformed. The smaller spots could also coalesce. In this way the abnormality extended to the entire surface of the leaf (fig. 4B). With age the plants more or less recovered, showing a diffuse mosaic in the higher leaves. The latter symptom could easily be confused with those of bean yellow mosaic.

In Beka bean TRV is distinguished from the other three isolates by a later appearance of the systemic symptoms. After inoculation with this isolate the first trifoliate leaf was generally almost normal, with only a few small, asteroid spots. The younger leaves, however, produce the normal type of symptoms. One month after inoculation there was no difference in symptom expression between TRV and the other isolates.

In the dilution tests it appeared like the slow type of systemic infection was due to a low concentration of the virus in the inoculum.

Thus symptoms could vary from a severe type of reaction to a mild type. The former consisted of serious necrosis in the petiole of the inoculated primary leaves and a systemic vein clearing beginning in the first ternate leaf. The latter type was characterized by absence of necrosis, presence of some areas of systemic vein clearing in the first ternate leaf and a more general vein clearing in subsequent leaves. Finally even an initial visible reaction in the second ternate leaf was possible.

In the bean varietal reaction test eight bean varieties reacted similarly with only slight differences in severity of symptoms. All varieties showed the characteristic grayish internal discoloration of the petioles of the inoculated primary leaves and systemic vein clearing. Seven weeks after inoculation the plants were

FIG. 1. Wilting in peas (*Pisum sativum* L.), var. Eroica, inoculated with the white clover mosaic virus. Right, healthy plants.

Verwelkingsverschijnselen in erwt (Pisum sativum *L.*), *ras Eroica, na inoculatie met het witte-klavermozaïekvirus. Rechts, gezonde planten.*

FIG. 2. Diffuse mottle in peas (*Pisum sativum* L.), var. Fertilas, inoculated with the white clover mosaic virus.

Diffuse gevlektheid in erwt (Pisum sativum *L.*), *ras Fertilas, na inoculatie met het witte-klavermozaïekvirus.*

A B

FIG. 3. Primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), var. Beka, inoculated with the white clover mosaic virus. A, 5 days after inoculation; B, 14 days after inoculation (After VAN DER WANT, 1954).

Primaire bonebladeren (Phaseolus vulgaris *L.*), *Ras Beka, geïnoculeerd met het witteklavermozaïekvirus. A, 5 dagen na inoculatie; B, 14 dagen na inoculatie.* (*Naar van der Want, 1954*).

A B

FIG. 4. Leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), var. Beka, showing systemic symptoms eleven days after inoculation of the primary leaves. A, Local irregular clearing of the tiny reticulated veinlets; B, more general vein clearing. (B, After VAN DER WANT, 1954.)

Bonebladeren (Phaseolus vulgaris *L.*), *ras Beka, met spreidsymptomen elf dagen na inoculatie van de primaire bladeren. A, Plaatselijke, onregelmatig begrensde, chlorotische verkleuring van de fijne nerven; B, meer algemene nerfverkleuring.* (*B, Naar van der Want, 1954.*)

FIG. 5. Leaves of crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) showing a diffuse mosaic caused by the white clover mosaic virus, artificial infection. Right, healthy leaf.

Bladeren van inkarnaatklaver (Trifolium incarnatum *L.*) *met een diffuus mozaïek na kunstmatige infectie met het witte-klavermozaïekvirus. Rechts, gezond blad.*

FIG. 6. Leaves of red clover (*Trifolium pratense* L.) showing mosaic symptoms caused by the white clover mosaic virus, artificial infection. Right, healthy leaf.

Bladeren van rode klaver (Trifolium pratense *L.*) *na kunstmatige infectie met het witte-klavermozaïekvirus. Rechts, gezond blad.*

FIG. 7. Systemic, diffuse yellow spots on the secondary leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) artificially infected with the white clover mosaic virus. Right, healthy leaf.

Systemische, diffuus gele vlekjes op de secondaire bladeren van komkommer (Cucumis sativus *L.*) *na kunstmatige infectie met het witte-klavermozaïekvirus. Rechts, gezond blad.*

FIG. 8. Electron micrograph of the particles characteristic for the white clover mosaic from sap of pea. Preparation made by the spray method. Magnification · 20,000. (Photograph made by the Physico-Technical Service for Agriculture, Wageningen).

Elektronenmicroscopische foto van in erwtesap voorkomende deeltjes, welke karakteristiek zijn voor het witte-klavermozaïek. Vergr. 20.000 · . (Foto gemaakt door de Stichting Landbouw Fysisch-Technische Dienst, Wageningen).

only slightly stunted. The younger leaves were somewhat smaller than normal, and showed a diffuse coarse mottle and an irregular surface. Some younger pods developed small sunken spots.

3. In broad bean (*Vicia faba* L.), variety "Driemaal Wit": Systemic symptoms in the younger leaves were visible about eight to nine days after inoculation. The consisted of somewhat diffuse ring-like spots and sometimes, especially with isolate ER, also of some local, faint, irregularly bordered vein clearing. After some time, a mild mosaic including some slight vein clearing within the light green areas was predominant in the upper leaves.

4. Cowpea (*Vigna sinensis* ENDL.) variety 37 c–6: Small chocolate-brown necrotic lesions developed on the upperside of the primary leaves six days after inoculation. The systemically infected trifoliate leaves showed an irregular mosaic pattern. The "Black eye" cowpea did not show the brown local lesions on the inoculated primary leaves, but in a repeated trial with the isolate WKV faint chorotic rings, measuring about 1.5 mm, were observed. This variety also showed a faint systemic mosaic.

5. In white clover (*Trifolium repens* L.) the symptoms were hardly visible. In the experiments a number of plants developed a faint diffuse mottle. Since clovers genetically are very variable, their reaction to viruses may also show a great variation.

6. Crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) generally showed an irregular, diffuse mosaic (Fig. 5).

7. Red clover (*Trifolium pratense* L.) showed the first clear symptoms about eight days after inoculation. The syndrome varied from an irregular diffuse mottle, sometimes in combination with a clearing of veins, to a distinct mosaic more or less parallel to the side-veins (fig. 6). Severely diseased leaves generally had an irregular surface and curled edges.

8. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) showed numerous yellow-green spots on the inoculated cotyledons five days after inoculation. Later diffuse yellow spots on the secondary leaves developed (fig. 7).

Infectivity tests

Although the research on white clover mosaic virus was carried out very carefully we sometimes got infection of a single control plant. Thus, the idea arose that the virus might be very contagious. Therefore we made some tests with Beka beans to study the infectivity of the virus in more detail. The results will be briefly summarized.

1. *a.* A diseased leaf was rubbed very gently over the upper surface of the leaves of healthy plants, without extra pressure. Results: 1/8 (1 plant infected of 8 plants tested); typical symptom reaction.
   b. do, but with some pressure of the finger. Results: 7/8; mild reaction.
   c. do, but with heavy pressure, both leaves damaged visibly. Results: 8/8; severe reaction.
   d. Finger rubbed over diseased leaf and then over healthy leaves. After each plant, rubbing over diseased leaf repeated. Results: 2/8; very mild reaction.
2. *a.* Leaves inoculated by means of rubbing with the finger without the use of carborundum. Results: 8/8; very severe reaction.

b. Leaves inoculated with finger still wet after having used it for method 2a and cleaned by rinsing with tapwater. Results: 7/8; rather severe reaction.

3. Plants inoculated in a normal way (carborundum) with material of an infected leaf of French bean dried on the laboratory table for 12 days and afterwards ground in a mortar with some water. Results: 3/8; rather mild reaction.
4. Normal inoculation with sap of a diseased plant and carborundum. Results: 3/3: very severe and typical symptoms.

The results obtained indicate that the virus is rather contagious and in experiments should be handled carefully to prevent unintentional spread.

To check the possibility of transmission in the field by contact of plants the following experiment was made. Two pots containing a total of seven diseased French bean plants were surrounded by ten pots, each containing four healthy plants. At one side from a distance of about 60 cm during the first 19 days one hour per day, except on Sunday, by means of a small oscillating fan, air was blown over this group of plants causing mutual contact. One month after the beginning of the trial all 34 test plants which had survived showed symptoms of white clover mosaic virus infection.

Transmission by dodder

Successful transmission of the virus by means of dodder was demonstrated in a preliminary trial with the isolate DEL. Therefore with the isolate WKV a more extensive test was carried out.

Dodder stems, after having parasitized diseased broad beans and peas, were transferred to healthy broad beans and peas, five pots each. The dodder was tested for presence of the virus by rubbing expressed sap onto the leaves of Beka beans. In one out of eight plants a positive reaction was obtained. After two weeks with the same dodder this test was repeated resulting in a very conclusive WKV reaction in three out of eight Beka plants. The broad bean and pea plants, parasitized by the infectious dodder in the meantime began showing virus symptoms. These were not conclusive, however, due to abnormal growth of the plants. Two back inoculations onto Beka bean plants indicated the presence of the white clover mosaic virus. Back inoculations 4½ weeks after transferring the dodder to the plants concerned, were more conclusive (from peas seven out of seven Beka plants with very distinct symptoms) than three weeks after inoculation with dodder (from peas one out of seven Beka plants with a distinctive reaction, from broad bean four out of seven Beka plants with a questionable reaction).

The results of these studies indicate that dodder can become infected with white clover mosaic virus by parasitizing diseased plants, and that it can transmit the virus to healthy plants.

Transmission by insects

No transmission was obtained in two experiments with two types of the green pea aphid, with the green peach aphid and the black bean aphid after infection feeding periods of 5, 10, 15 and 30 minutes on peas used as test plants. To check these results from several test plants back inoculations were made, without results however.

To make results more meaningful in a third experiment with the green pea aphid and the green peach aphid the feeding periods were controlled by means of a stopwatch. With the green pea aphid 5 insects fed 15 sec., 105 sec., 150 sec. and 195 sec., respectively. With the green peach aphid 1 insect fed 7 sec. 4–10 sec., 4–15 sec., 2–20 sec., 1–25 sec., 1–35 sec., 1–40 sec., 4–60 sec., 1–70 sec., respectively. No symptoms were induced in the peas used as test plants. Likewise no transmission was obtained in a similar experiment with the green peach aphid when the observed infection feeding periods were varied from one to five minutes on healthy Beka beans used as test plants.

These results indicate that no insect transmission takes place with the aphid species tested. This is not in agreement with the results formerly obtained by one of the authors (VAN DER WANT, 1954): even at that time results were very poor, however, transmission being obtained with only 2 out of 32 *Myzus persicae* and none out of 16 *Aphis fabae*.

Physical properties

The results of the thermal inactivation tests and of the dilution tests were quite consistent, as are the data published in the literature on the white clover mosaic virus (table 2). Several tests with the same isolate produced different results, e.g. isolate WKV once was inactivated between 58° and 60°C, once between 60° and 62°C and in another test between 65° and 70°C. In this way certain differences between the isolates obtained in one test often differed from those obtained in another test. The highest inactivation point observed was between 65° and 70°C. In this case the reaction of the Beka beans used as test plants was very weak, the incubation period being about twice as long as normal, whereas the primary reaction failed entirely (see p. 96). Presumably this slow type of reaction is due to a very low concentration of the virus in the inoculum.

In the same way the results of dilution tests varied from complete inactivation at a dilution of 10^{-4} to an inactivation at a dilution higher than 10^{-9}. The latter dilution endpoint is exceptionally high. In the literature data on the dilution endpoint of this virus range from about $1:2 \times 10^3$ to 10^{-6} (table 2).

Apparently in these experiments the virus concentration in the original

TABLE 2. Physical properties of the white clover mosaic virus according to literature.
Fysische eigenschappen van het witte-klavermozaïekvirus naar gegevens uit de literatuur.

References *Literatuur*	Thermal inactivationpoint *Thermale inactiveringspunt*	Dilution endpoint *Verdunningseindpunt*	Days of ageing in vitro *Houdbaarheid in vitro in dagen*
ZAUMEYER & WADE (1955) . . .	58°–65°C	±1/2000	28–32 hrs
PIERCE (1935)	< 58°C		5–7
JOHNSON (1942) "pea mottle" . .	60°–62°C	1/10,000–1/100,000	>31
"pea wilt" . . .	58°–60°C	1/100,000–1/1,000,000	>31
VAN DER WANT (1956) isolate 1947	60°–65°C	1/100,000–1/1,000,000	
isolate 1953	60°–65°C	>1/10,000	> 3
QUANTZ (1956)	> 58°C	1/100,000–1/1,000,000	>20

material played an important role in determining the thermal inactivation and dilution endpoints.

The three isolates WKV, TRV and DEL tested for ageing *in vitro* were still infective after 99 days. Then the stored sap of Beka bean possessed an exceptionally offensive odor. All three isolates were still active in dry leaves from Beka bean, 13 days after harvesting. Isolate WKV was still active after 21 days, but not after 29 days.

Electron microscopy

Morphologically the particles observed from diseased plants (fig. 8) were quite the same as those pictured by VAN DER WANT (1954) and BRANDES & QUANTZ (1957). The peak of the frequency curves generally falls in the column of 475 mμ. This is in agreement with the standard length of 476 mμ estimated by BRANDES & QUANTZ. As already pointed out in a recent paper (HAGEDORN, BOS & VAN DER WANT, 1959) our length measurements are not yet accurate enough to furnish a reliable basis for exact comparison with the results obtained by the above German authors.

In host range studies with the isolate WKV, ER and TRV, we tested the plants as a source of inoculum and afterwards also the inoculated plants for the presence of the virus. The results are summarized in column 1 of table 1. Particles could be seen from all plant species, except cucumber, which appeared to be infected as shown by symptom expression and back inoculation. However, pea plants back inoculated with sap from cucumber showing symptoms, also produced particles visible with the electron microscope. In most cases they could be easily detected even in white clover with very faint or no symptoms. Generally large quantities of particles were present in susceptible plants (fig. 8). No particles were found in the non-leguminous plants studied.

In morphology and particle lengths distribution no differences could be observed between the three isolates mentioned above and isolate DEL, or between the host plants. Cowpea gave similar results to those obtained with the other host plants. Likewise pea plants inoculated with sap of infected cucumber contained particles with the same morphology and distribution curve as the other hosts. This furnished further evidence of the ability of the white clover mosaic virus as a whole to infect cowpea as well as cucumber. The existence of special components as published by JOHNSON (1942) could not be shown.

In preparing the electron micrographs we used the spraymethod (p 000). This resulted in a clear tendency of the particles to break into smaller parts. Often some of these smaller parts, having the total length of the assumed particle unit, were lying closely together. In applying this method to the red clover vein-mosaic virus a similar effect was found (HAGEDORN, BOS & VAN DER WANT, 1959).

Serology

VAN DER WANT (1954) prepared three antisera against the isolates 1947 and 1953 of the virus. He was able to demonstrate a specific reaction of these sera with the white clover mosaic virus. No serological relation could be observed between the white clover mosaic virus on one hand, the alfalfa mosaic virus and the bean yellow mosaic virus on the other. One of these antisera (1.4.15) was

used to test our isolates and also to compare it with a freshly prepared antiserum (7.5.40) against the isolate DEL. The results of these tests are summarized in table 3. The precipitate was clear and fluffy. In this test the four isolates appeared to react similarly.

The white clover mosaic virus appears to have some characters in common with potato virus X. Therefore the antisera were tested reciprocally but no serological relation could be shown.

HAGEDORN, BOS & VAN DER WANT (1959) could not show a serological relationship between the white clover mosaic virus and the red clover vein-mosaic virus.

DISCUSSION

The results obtained with the four Dutch isolates of the white clover mosaic virus indicate that they do not differ fundamentally.

As to symptoms, experimental host range and physical properties no substantial differences appeared to exist between the Dutch virus and the white clover mosaic viruses described in the United States of America and in Germany. So the most authentic name should be the "white clover mosaic virus" or *Trifolium virus* 1 ZAUMEYER & WADE. The symptoms in French bean are especially characteristic and of diagnostic value.

Concerning the complex nature of this virus, as was assumed by JOHNSON (1942), the results of the present authors agree with those of JOHNSON in so far that both cowpea and cucumber are susceptible to the virus. However, we were unable to show the existence of two components of the virus in The Netherlands. This was clearly demonstrated by means of tests repeated several times as back inoculations and electron microscopy. Our results indicate that our virus is in many ways the same as that described by JOHNSON, and that the Dutch virus is not of complex nature. Our results suggest that this holds true also for the American virus. Also BRANDES & QUANTZ (1957), who studied a German isolate of the virus in the electron microscope, could not reveal a complex nature of this German white clover mosaic virus.

The high infectivity of the virus, transmission even by contact, together with the high resistance to dilution, to ageing *in vitro*, and also to some extent to drying in detached infected leaves, and the presence of particles in infected susceptible plants in high concentrations, make the virus a potentially dangerous one. In experiments the white clover mosaic virus has to be handled carefully. These facts, and the observations made in our inventory studies of the viruses of leguminous crops, make it highly probable that we are dealing with a widespread virus. The fact that the virus is not or rarely found in annual crops such as peas and beans might be due to several reasons. In peas the symptoms are not very characteristic. In French beans some weeks after artificial inoculation the diffuse mosaic symptoms often suggest the presence of bean yellow mosaic virus. So it might be that possible infections of these crops with this virus are not recognized. Presumably the virus is not important in these crops because of absence of insect vectors. This virus may be of importance, however, in meadows and lawns. Possibly the virus is spread by mowing and may be by the grazing of cattle.

The results of insect-transmission tests obtained thus far suggest the absence of important insect vectors. Positive transmissions with two out of 32 green

TABLE 3. Reaction of two antisera with four Dutch isolates of the white clover mosaic virus.
Reactie van twee antisera met vier Nederlandse isolaties van het witte-klavermozaïekvirus.

Dilutions of sap of Beka beans *Verdunningen sap van Beka bonen*		Antiserum 1.4.15 *Antiserum 1.4.15*				Antiserum 7.5.40 *Antiserum 7.5.40*				Normal serum [1] *Normaal serum* [1]	Saline *Fysiologisch zout*
		1/4	1/16	1/64	1/256	1/4	1/16	1/64	1/256		
isolate WKV *isolatie WKV*	1/4	+++[2]	++	+	—	+++	++	+	—	—	—
	1/16	+	+	—	—	++	+	—	—	—	—
	1/64	—[3]	—	—	—	—	—	—	—	—	—
isolate ER *isolatie ER*	1/4	++	+	—	—	+++	++	++	+	—	—
	1/16	+	—	—	—	++	+	+	—	—	—
	1/64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
isolate TRV *isolatie TRV*	1/4	+++	++	+	—	+++	++	+	—	—	—
	1/16	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
isolate DEL *isolatie DEL*	1/4	+++	++	+	—	+++	++	+	—	—	—
	1/16	+	—	—	—	++	+	—	—	—	—
	1/64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
healthy *gezond*	1/4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[1] All dilutions tested (1/4 to 1/1024) reacted similarly.
Alle getoetste verdunningen (1/4 tot 1/1024) reageerden gelijk.

[2] The number of + signs is an indication for the quantity of precipitate.
Het aantal + tekens is een maat voor de hoeveelheid precipitaat.

[3] No precipitate.
Geen precipitaat.

pea aphids (and none out of 16 black bean aphids) formerly obtained by one of the authors (VAN DER WANT, 1954) being not entirely conclusive in view of the ease of contamination.

In the electron microscope morphologically the particles, characteristic for white clover mosaic, have the same appearance as those of potato virus X disease, as was already pointed out by BRANDES & QUANTZ (1957). According to these authors the only difference is the accurate length, being 476 mμ for the white clover mosaic virus and 515 mμ for potato virus X. Both viruses appear to have many features in common, e.g. high dilution endpoint and thermal inactivation point, high resistance to ageing *in vitro*, resistance to drying in the leaf, and probably the absence of aphid vectors. Potato virus X could also be transmitted mechanically to the leguminous host *Trifolium incarnatum*. *Nicotiana tabacum* and *Gomphrena globosa*, being useful indicators for potato virus X, however, were not infected by white clover mosaic virus after mechanical inoculation. In crimson clover no cross protection could be demonstrated. Both viruses also appeared to differ serologically.

It is interesting to emphasize the fact that the white clover mosaic virus appears to have an experimental host range not restricted to leguminous plants. Probably the same applies for the natural host range. More and more evidence is obtained that this holds for other so called legume viruses as well.

SUMMARY

Four isolates of a white clover mosaic virus found in The Netherlands were studied. The virus was compared with the white clover mosaic virus (*Trifolium virus* 1 ZAUMEYER & WADE) described in America.

No evident differences between the four Dutch isolates could be shown.

In the host range studies the legumes *Phaseolus vulgaris* L. (all eight varieties tested), *Pisum sativum* L. (all twelve varieties tested), *Trifolium incarnatum* L., *T. pratensis* L., *T. repens* L., *Vicia faba* L. and *Vigna sinensis* ENDL., and the non-leguminous species *Cucumis sativus* L. were susceptible. No infection was obtained in the legume *Phaseolus coccineus* L. (both two varieties tested) and the non-leguminous species *Dianthus barbatus* L., *D. caryophyllus* L., *Gomphrena globosa* L. and *Spinacia oleracea* L., and presumably not in the legume *Medicago sativa* L.

The symptoms in susceptible host plants are described in detail.

The virus is very infectious. Transmission even occurs by contact.

Transmission by means of *Cuscuta campestris* YUNCKER was confirmed. The presence of virus in this parasite could be demonstrated.

In insect transmission tests with *Acyrthosiphon pisum* HARRIS, *Myzus persicae* SULZ. and *Aphis fabae* SCOP., even after a long starvation period and short infection feeding periods, no transmission could be obtained.

Results of physical property tests were quite inconsistent, but generally in agreement with data already published. The thermal inactivation point varied between 58°–60° C to 65°–70° C. The dilution endpoint varied from above 10^{-4} to lower than 10^{-9}, which in the latter case is extremely low. In the ageing *in vitro* tests the virus was still active after 99 days storage. In air-dried leaves the virus was active once after 21 days, but not after 29 days.

As studied in the electron microscope the occurrence of threadlike particles

measuring about 475 mμ, generally occurring in large quantities, was confirmed.

A new antiserum was tested together with one prepared earlier by VAN DER WANT (1954). All four isolates of the virus reacted similarly.

The virus studied appeared to be very similar to the American "white clover mosaic virus" (ZAUMEYER & WADE, 1935; PIERCE, 1935) and the German "Weisskleevirus" (QUANTZ, 1956). On the basis of host range studies, symptomatology and electron microscopy the assumption of JOHNSON (1942) as to the complex nature of this virus could not be confirmed.

The white clover mosaic virus turned out to have many features in common with the potato virus X. In certain respects, however, these viruses differ fundamentally.

SAMENVATTING

Het in Nederland reeds door VAN DER WANT (1954) aangetoonde witteklavermozaïekvirus werd bestudeerd aan de hand van vier isolaties (WKV uit witte klaver, ER uit erwt, TRV uit rode klaver en DEL uit een complex met erwtemozaïekvirus in erwt). Het Nederlandse virus werd vergeleken met het Amerikaanse „white clover mosaic virus" (*Trifolium virus* 1 ZAUMEYER & WADE). Dit virus zou volgens JOHNSON (1942) bestaan uit een complex van het „pea wilt" virus (te isoleren met *Vigna sinensis* ENDL.) en het „pea mottle" virus (te isoleren met niet-leguminosen zoals komkommer, of door overbrenging met *Cuscuta campestris* YUNCKER).

De vier bestudeerde Nederlandse isolaties vertoonden geen duidelijke verschillen.

In het waardplantonderzoek werd de vatbaarheid van een aantal plantesoorten nagegaan op grond van de symptomen, teruginoculatie en met behulp van de elektronenmicroscoop. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1. Door middel van teruginoculatie kon worden aangetoond dat *Vigna* en komkommer beide met hetzelfde virus waren besmet als de andere vatbare plantesoorten. Zo was het ook mogelijk uitgaande van *Vigna* komkommer te infecteren en omgekeerd.

Acht bonerassen en twaalf erwterassen werden getoetst. Ze bleken alle vatbaar in tegenstelling met de twee getoetste pronkbonerassen.

De ziekteverschijnselen, die de vatbare plantesoorten in de kas vertoonden, werden uitvoerig beschreven. In erwten treedt vooral een aan de basis van de plant beginnende verwelking op de voorgrond (fig. 1). Vooral bij weinig licht en een relatief hoge temperatuur sterven de planten vaak geheel af. Is dit niet het geval dan vertonen de hogere bladeren meestal een diffuse gevlektheid (fig. 2). In bonen (*Phaseolus vulgaris* L.) is de reactie zeer karakteristiek en van diagnostische betekenis. De eerste symptomen bestaan vaak uit kleine chlorotische vlekjes op de geïnoculeerde, enigszins epinastische primaire bladeren (fig. 3A). Na enige tijd vertonen deze vlekjes de neiging langs de rand en/of in het centrum necrotisch te worden (fig. 3B). Opvallend is vooral de grauwgrijze, meestal inwendige, pleksgewijze verkleuring in stelen en grovere nervatuur der geïnoculeerde, primaire bladeren (fig. 3B) en tevens in het basale gedeelte der stengel. Deze verkleuring bleek gevolg te zijn van ophoping van bruine gomachtige stoffen, samengaand met necrose, in parenchymatisch weefsel. Ook zeer typerend is de systemische reactie in de samengestelde bladeren. Deze bestaat uit een plaatselijke, onregelmatig begrensde, tot een algemenere chlorotische

verkleuring van de fijne nerven (fig. 4) en veelal in mindere mate van het aangrenzende bladmoes. Na verloop van tijd kunnen de planten zich min of meer herstellen, waarbij de jongere bladeren een diffuse, grove bontheid vertonen. Bij de klaversoorten bestaan de ziekteverschijnselen uit een min of meer diffuse gevlektheid (fig. 5), die bij de rode klaver soms vrij scherp begrensd kan zijn (fig. 6). Bij witte klaver is de gevlektheid daarentegen vaak zeer onduidelijk, terwijl de symptomen herhaaldelijk geheel ontbreken. Bij komkommer ontstaan op de geïnoculeerde zaadlobben een groot aantal lichtgekleurde puntjes, terwijl de hogere bladeren later diffuus gele vlekken vertonen (fig. 7).

Het bleek, dat het virus zeer besmettelijk is en zelfs door onderling contact van plant op plant kan overgaan. Proeven met warkruid bevestigden de mogelijkheid het virus met de soort *Cuscuta campestris* over te brengen en met dit virus karakteristieke witte-klavermozaïeksymptomen te doen ontstaan in erwten en bonen. Ook bleek het mogelijk, door sap van de voor virusoverdracht benutte warkruidplanten als inoculum te gebruiken, virus hierin aan te tonen.

Proeven om het virus over te brengen met behulp van de erwtebladluis (*Acyrthosiphon pisum* HARRIS), de perzikbladluis (*Myzus persicae* SULZ.) en de zwarte boneluis (*Aphis fabae* SCOP.) na een voorafgaande hongerperiode van één tot drie uur, bij korte zuigtijden op de infectiebron (in een eerste proef variërend van 5–30 min. en in een tweede proef van 7–70 sec.), hadden slechts negatief resultaat. Waarschijnlijk kan het virus niet door bladluizen worden overgedragen.

De resultaten van een aantal proeven ter bepaling der fysische eigenschappen liepen, zelfs voor elke virusisolatie, sterk uiteen. Het thermale inactiveringspunt varieerde van 58°–60° C tot 65–70° C. In één geval kon geen virusactiviteit meer worden aangetoond bij een verdunning van 10^{-4}, terwijl éénmaal met twee isolaties (WKV en TRV) bij een verdunning van 10^{-9} nog infecties konden worden teweeggebracht. Deze laatste verdunningsgrens is voor een plantevirus uitzonderlijk hoog. Het uiteenlopen van de verkregen gegevens vertoont overeenstemming met de grote onderlinge verschillen tussen in de literatuur vermelde waarden (tabel 2). Het virus bleek na 99 dagen bewaring *in vitro* nog een hoge infectiositeit te bezitten. In aan de lucht gedroogde bladeren was 13 dagen na het oogsten nog actief virus aanwezig, in één geval zelfs na 21 dagen, echter niet meer na 29 dagen.

De met de elektronenmicroscoop bestudeerde, draadvormige, ongeveer 475 mμ lange deeltjes komen overeen met die, welke voor het eerst door VAN DER WANT (1954) zijn afgebeeld. Ze komen meestal voor in grote hoeveelheden (fig. 8), zelfs in witte-klaverplanten zonder symptomen.

Eén der door VAN DER WANT (1954) bereide antisera (1.4.15) tegen de isolatie WKV en een nieuw antiserum (7.5.40) tegen de isolatie DEL reageerden positief en op gelijke wijze met alle vier isolaties van het virus (tabel 3).

Uit het onderzoek is gebleken, dat het bestudeerde virus identiek is met het in Amerika optredende „white clover mosaic virus" (ZAUMEYER & WADE, 1935; PIERCE, 1935) en met het in Duitsland voorkomende „Weisskleevirus" (QUANTZ, 1956). De conclusie van JOHNSON (1942), dat het „white clover mosaic virus" van complexe aard zou zijn, kon niet worden bevestigd. Het in Nederland optredende virus komt zowel overeen met het „pea wilt virus" als met het „pea mottle virus", daar *Vigna sinensis* en komkommer beide door de hier beschreven isolaties van het witte-klavermozaïekvirus kunnen worden aangetast. Dit

bleek door middel van teruginoculatie op erwten, bonen, *Vigna* en komkommer. Ook elektronenmicroscopisch was geen verschil waarneembaar in virusdeeltjes na passage door *Vigna* en door komkommer.

De hoge besmettelijkheid van het virus, de overgang van het virus zelfs door contact, het hoge verdunningseindpunt, de lange houdbaarheid *in vitro* en in beperktere mate in gedroogd blad, doen vermoeden, dat het virus veelvuldiger voorkomt dan thans bekend is. Dat het virus nauwelijks is waargenomen op éénjarige gewassen kan een gevolg zijn van het ontbreken van overdragende insekten. Ook is het mogelijk, dat b.v. in bonen de symptomen niet als die van witte-klavermozaïekvirus worden herkend, daar enige weken na de infectie de verschijnselen in de hoger geplaatste bladeren enige overeenkomst vertonen met die van het scherpmozaïek. Mogelijk treedt het virus veelvuldig op in weilanden, gazons e.d. waar het, gezien de hoge besmettelijkheid, waarschijnlijk gemakkelijk kan worden verspreid met het maaien of misschien zelfs door weidend vee.

In vele opzichten vertoont het virus overeenkomst met het X-virus van de aardappel, hoewel er enkele fundamentele verschillen, zoals in serologische eigenschappen en in lengte der deeltjes, bestaan.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to Mr. D. Z. Maat and Miss H. de Wit for their continuous assistance. They are obliged to Miss Dra. C. van der Scheer and Mr. S. Henstra, Physico-Technical Service for Agriculture, Wageningen, for doing the electron microscopy. They wish to express their appreciation to Prof. Dr. D. J. Hagedorn, University Wisconsin U.S.A., for help with the English text.

REFERENCES

Bos, L. &. J. P. H. van der Want, – 1958. Virusziekten van vlinderbloemigen. Landbouwvoorl. 15: 550–558, 573–587.

Brandes, J. & L. Quantz, – 1957. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Weisskleevirus und des Steinkleevirus. Arch. Mikrobiol. 26: 369–372.

Hagedorn, D. J., L. Bos & J. P. H. van der Want, – 1959. The red clover vein-mosaic virus in The Netherlands. T. Pl.ziekten 65: 13–23.

Johnson, F., – 1942. The complex nature of white clover mosaic. Phytopath. 32: 103–116.

Pierce, W. H., – 1935. The identification of certain viruses affecting leguminous plants. J. agr. Res. 51: 1017–1039.

Quantz, L., – 1956. Zum Nachweis des Luzernemosaikvirus in Deutschland und Italien. Phytopathol. Z. 28: 83–103.

Slogteren, D. H. M. van, – 1955. Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse–Wageningen, 1954: 51–54.

Want, J. P. H. van der, – 1954. Onderzoekingen over virusziekten van de boon (Phaseolus vulgaris L.). Diss. Wageningen, 84 pp.

Want, J. P. H. van der & L. Bos, – 1958. Onderzoekingen over virusziekten van vlinderbloemigen. T.Pl.ziekten 64: 419–421.

Zaumeyer, W. J. & B. L. Wade, – 1935. The relationship of certain legume mosaics to bean. J. agr. Res. 51: 715–749.

T.Pl.ziekten 65 (1959): 107–115

HET VOORKOMEN VAN RESISTENTIE TEGEN ORGANISCHE FOSFORVERBINDINGEN BIJ DE BONESPINTMIJT (*TETRANYCHUS URTICAE*) IN AALSMEER[1])

With a summary: The occurrence of resistance to organic phosphorcompounds in the two-spotted spider mite (Tetranychus urticae) *at Aalsmeer*

DOOR

W. HELLE

Proefstation voor de Bloemisterij, Aalsmeer

INLEIDING

In de bloementeelt zijn aantastingen door de bonespintmijt (*Tetranychus urticae* AUCT.) algemeen. Vooral snijbloemen zoals roos en anjer zijn zeer gevoelig voor spintmijt en de teelt is slechts dan rendabel, indien het spint regelmatig en afdoende bestreden wordt. Ook in andere gewassen zoals *Gerbera*, *Hydrangea* en vele potplanten kunnen spintmijten schadelijk zijn, doch in deze planten is hun optreden minder frequent en draagt het een meer incidenteel karakter.

In de tijd toen de moderne synthetische bestrijdingsmiddelen nog onbekend waren, was de spintbestrijding een moeilijk probleem. Voor de chemische bestrijding had men de beschikking over minerale olie, vruchtboomcarbolineum en naftaline. De bruikbaarheid van deze middelen was echter beperkt, daar ze schade veroorzaakten in de vorm van bladverbranding en miskleuring van bloemen (VAN MARLE, 1951).

Mechanisch kan spint bestreden worden door het zogenaamde spintspuiten, waarbij het gewas met een krachtige waterstraal langdurig bespoten wordt. Hoewel spintspuiten ook thans nog wordt toegepast is de betekenis ervan toch sterk afgenomen.

Met het verschijnen van parathion, tepp, systox en vele andere organische fosforverbindingen bleek een eenvoudige en afdoende bestrijding van een spintplaag mogelijk en deze middelen werden dan ook in de praktijk algemeen gebruikt. In 1950 werd melding gemaakt van een geval van resistentie van spint tegen parathion bij een rozenkweker in Aalsmeer-Oost (VAN MARLE, 1951). Nadien werd dit verschijnsel ook op enkele andere bedrijven geconstateerd.

Resistentie treedt op door het uitselecteren van enkele reeds aanwezige individuen met een bepaalde genetische constitutie. Bij herhaalde behandelingen met een bepaald middel kan na een aantal generaties een populatie ontstaan, welke een volledige resistentie bezit. Resistentie treedt dan ook het snelst op bij die soorten, die zich snel kunnen ontwikkelen. Gezien het grote aantal generaties van spint in rozenkassen, is deze zo spoedig optredende parathion-resistentie van spint in Nederland niet verwonderlijk.

Om een indruk te krijgen van de huidige stand van omvang en verspreiding van deze resistentie, werd van april tot november 1958 een onderzoek ingesteld. Hiertoe werd van een aantal willekeurige bedrijven te Aalsmeer spint verzameld

[1]) Aangenomen voor publikatie 20 februari 1959.

en op gevoeligheid voor diverse acariciden onderzocht. Tevens werden spintpopulaties, welke afkomstig waren van onkruiden, tuinplanten e.d. uit de directe omgeving der bedrijven buiten de kas, in het onderzoek betrokken.

MATERIAAL EN METHODIEK

Jonge tweebladige planten van de stamslaboon, welke in met voedingsoplossing gevulde erlenmeyerkolfjes stonden, werden bij de proeven gebruikt. De op de boneplantjes gebrachte spintmijten konden de waardplant niet langs de stengel verlaten. Het percentage mijten, dat zich van de bladeren liet vallen, bleek klein, hoogstens 5 %. Voor het vaststellen van de resistentie werd een boneplantje met een der middelen bespoten. De hoeveelheid verspoten vloeistof bedroeg ca. 50 ml per plant. Naast de gebruikte middelen werd als controle ook een plant met water behandeld.

Een uur na de bespuiting werden 25 à 30 mijten op elk van de beide bladeren gebracht, zodat bij elke bepaling minimaal 50 mijten betrokken waren. Dit waren uitsluitend volwassen wijfjes. Daar volgens LEES (1953) de diapausevorm van de bonespintmijt een afwijkende activiteit vertoont en geen voedsel tot zich neemt, werden geen diapausevormen in de proeven gebruikt. Vier dagen later werd het sterftepercentage vastgesteld.

De meeste proeven werden in enkelvoud genomen, daar de uitkomsten duidelijke verschillen lieten zien tussen resistente en normaal gevoelige spintpopulaties. Slechts in een enkel geval werd het spint van een bedrijf op verschillende tijdstippen onderzocht.

In de algemene proef werden als organische fosforverbindingen de middelen parathion, diazinon en demeton (Systox) gebruikt. Ter vergelijking werd een acaricide uit de groep van de gechloreerde koolwaterstoffen gekozen, nl. kelthane.

In een verdere proefserie werden naast de reeds genoemde middelen nog thiometon, phosdrin, malathion, tepp, phenkapton en chloorbenzilaat gebruikt.

RESULTATEN

In fig. 1 wordt een overzicht gegeven van de dodingspercentages. De herkomst van de spintpopulaties is aangeduid met hoofdletters, welke overeenstemmen met de letters in de overzichtskaart van Aalsmeer (fig. 5).

Van de 22 in kassen verzamelde spintpopulaties blijken er 20 een duidelijke resistentie tegen organische fosforverbindingen te vertonen. Slechts het spint van de bedrijven L en V is normaal gevoelig. Op deze beide bedrijven was in de laatste jaren aan de spintbestrijding weinig zorg besteed.

De variatie in gevoeligheid van de resistente populaties tegen het middel demeton is opmerkelijk. Sommige spintpopulaties (b.v. van de bedrijven G,

FIG. 1, 2 en 4. Gevoeligheid van spintpopulaties te Aalsmeer voor verschillende behandelingen. *Susceptibility of two-spotted spider mite populations to different treatments.* w: water, p_1: parathion 0,05 %, p_2: parathion 0,025 %, di: diazinon 0,02 %, de: demeton 0,025 %, ke: kelthane 0,05 %, th: thiometon 0,02 %, po: phosdrin 0,0125 %, ma: malathion 0,1 %, te: tepp 0,03 %, pe: phenkapton 0,02 %, cb: chloorbenzilaat (*chlorobenzilate*) 0,025 %.

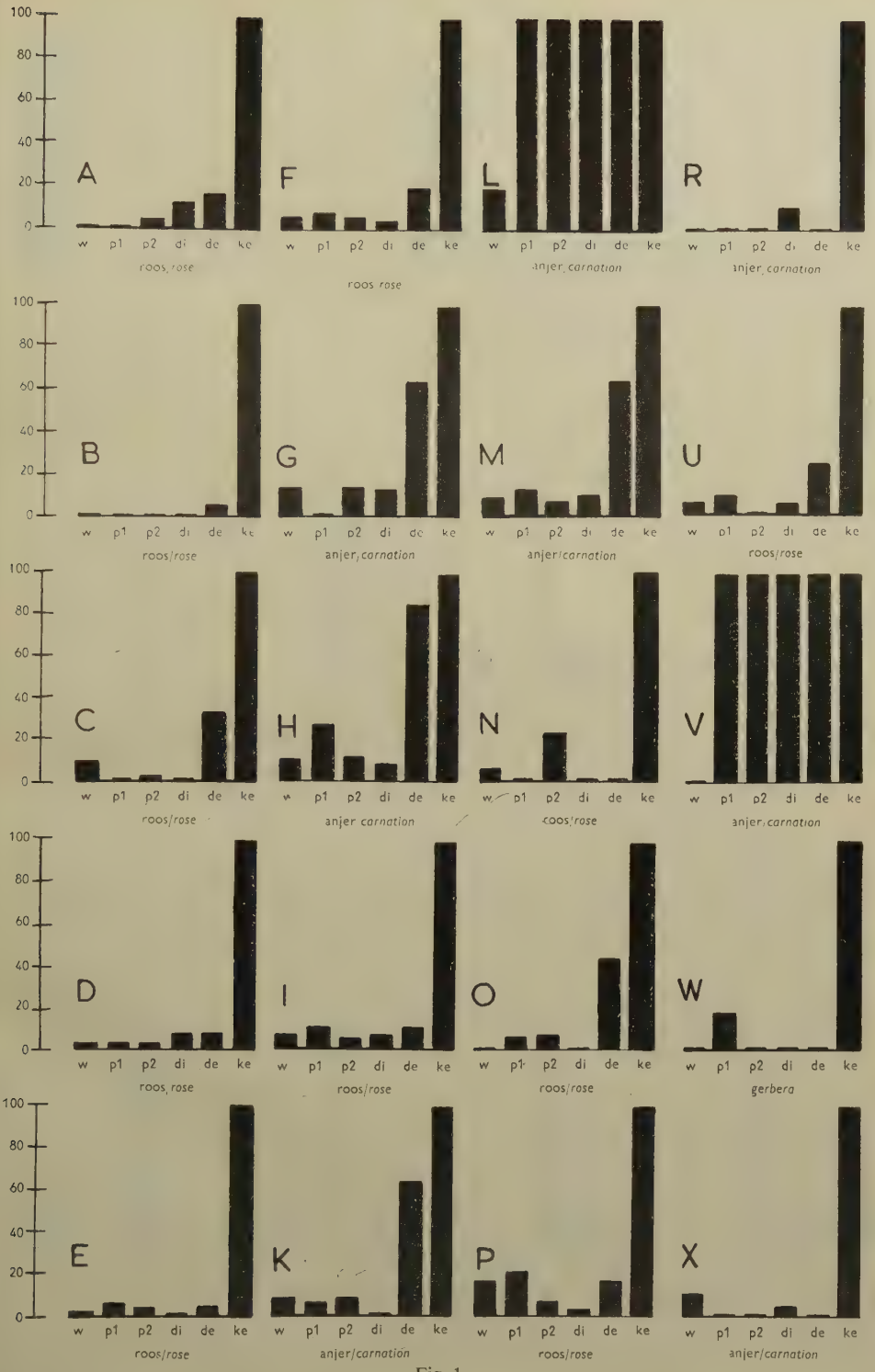

100
80
60
40
20
0
A
w p1 p2 di de ke
roos/rose
F
w p1 p2 di de ke
roos/rose
L
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
R
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
B
w p1 p2 di de ke
roos/rose
G
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
M
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
U
w p1 p2 di de ke
roos/rose
C
w p1 p2 di de ke
roos/rose
H
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
N
w p1 p2 di de ke
roos/rose
V
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
D
w p1 p2 di de ke
roos/rose
I
w p1 p2 di de ke
roos/rose
O
w p1 p2 di de ke
roos/rose
W
w p1 p2 di de ke
gerbera
E
w p1 p2 di de ke
roos/rose
K
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation
P
w p1 p2 di de ke
roos/rose
X
w p1 p2 di de ke
anjer/carnation

Fig. 1

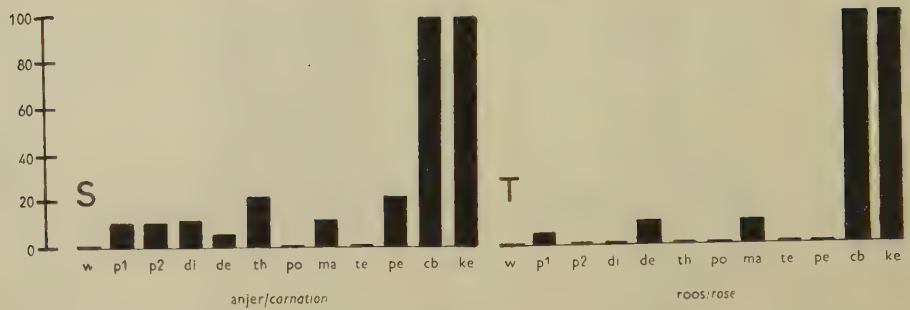


Fig. 2

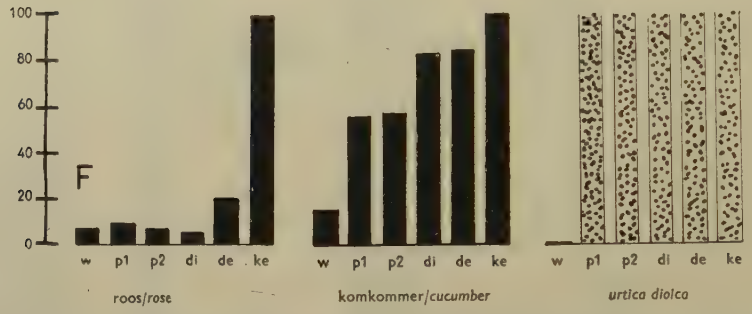


FIG. 3. Kas met twee gescheiden ruimten, waarbij alleen in het gedeelte met roos regelmatig een spintbestrijding is toegepast. De zwarte diagrammen hebben betrekking op spintpopulaties in de kas, het gespikkelde diagram op een spintpopulatie van brandnetel buiten de kas.

Greenhouse with two separated spaces; only in the part with rose the spider mite has been controlled regularly. The black diagrams refer to spider mite populations within the greenhouse, the speckled diagram to the population on nettle in the neighbourhood of the greenhouse.

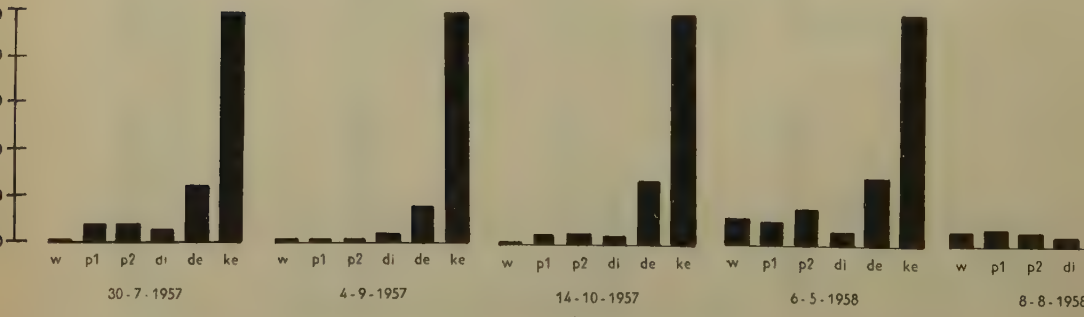


Fig. 4

Fig. 5. Overzichtskaart van Aalsmeer. De hoofdletters geven aan waar het onderzochte spint werd verzameld.

Map of Aalsmeer. The capitals indicate the holdings where the red spider mite populations were gathered.

H, K, M, O) zijn duidelijk gevoelig voor het middel, bij de meerderheid heeft de resistentie zich echter ook tot demeton uitgebreid.

Merkwaardig was het totaal ontbreken van resistentie bij het van de onkruiden buiten de kassen verzamelde spint. In totaal werd dit bij 16 bedrijven onderzocht en in al deze gevallen waren ook de organische P-middelen normaal werkzaam.

De gevoeligheid voor een groter aantal acariciden wordt door fig. 2 aangegeven. Het spint van de bedrijven S en T was nooit behandeld met de middelen thiometon, phosdrin of phenkapton. Toch zijn de mijten duidelijk ongevoelig voor deze middelen. Indien niet reeds bekend was, dat deze populaties tegen andere middelen resistent waren, zou men hier van resistentie bij de eerste generatie kunnen spreken. Dit feit demonstreert, hoe weinig specifiek de resistentie is. Hier is duidelijk sprake van resistentie tegen de gehele groep van de organische fosforverbindingen en niet van de middelen afzonderlijk. Bij andere dieren, bijv. de kamervlieg, was deze multi-resistentie reeds bekend. MELTZER (1956) toonde onder meer aan, dat bij de kamervlieg na selectie door een bepaald middel al dadelijk een polyvalente resistentie optreedt en dat zelfs de resistentie tegen andere insekticiden groter kan zijn dan tegen het selecterende middel.

De situatie van de spintpopulaties in bedrijf F geeft aanleiding tot een nadere

beschouwing (fig. 3). Het spint van de kasrozen is volledig resistent. Het spint, dat van brandnetel buiten de kas verzameld werd, blijkt een normale gevoeligheid te vertonen. De kweker had echter een van de eigenlijke rozencultuur gescheiden kasruimte in gebruik, waar ook enige komkommers met spintaantasting stonden. In deze kasruimte werden door hem uit veiligheidsoverwegingen geen bestrijdingsmiddelen toegepast. Als men de dodingspercentages van het spint uit deze kasruimte in ogenschouw neemt, kan men zich moeilijk aan de indruk onttrekken dat hier een vermenging van populaties heeft plaats gevonden.

Het spint van bedrijf F is in de loop van 1957 en 1958 herhaaldelijk op resistentie onderzocht (respectievelijk op 30 mei 1957, 4 sept. '57, 14 okt. '57, 6 mei '58 en 8 aug. '58). Fig. 4 laat zien, dat zich geen noemenswaardige verschuiving heeft voorgedaan.

DISCUSSIE

1. Het spint, dat zich in kassen een resistentie voor organische P-verbindingen opgebouwd heeft, komt niet buiten de kas voor.

In de 16 gevallen, dat buiten de kas spint werd aangetroffen, was steeds sprake van een normale gevoeligheid voor bestrijdingsmiddelen. Een open vraag is of resistente spintmijten de fysiologische constellatie voor een blijvende vestiging onder de milieu-omstandigheden buiten de kas missen. Interessant is in dit verband een opmerking van Smith (1956) in de U.S.A. dat resistente bonespintmijten uit een rozenkas de winter op onkruiden buiten niet konden overleven, terwijl niet-resistente mijten van dezelfde soort (*T. telarius* syn. *T. urticae*) de winter wel doorkwamen.

2. De resistentie treedt op de bedrijven spontaan op.

Er zijn geen aanwijzingen, dat zich in Aalsmeer een centrum van verspreiding van resistent spint zou bevinden of heeft bevonden. Het voorkomen van resistentie op de verschillende bedrijven is eerder een exponent van de frequentie en intensiviteit van de chemische bestrijding met organische fosformiddelen. Niet-resistente spintpopulaties werden dan ook op die bedrijven aangetroffen, waar de bestrijding minder intensief is geweest.

3. Resistentie treedt onafhankelijk van de waardplant op.

Daar resistent spint zowel op roos, anjer als *Gerbera* werd aangetroffen en geen enkele correlatie kon worden gevonden tussen waardplant en voorkomen van resistentie, is het moeilijk in te denken, dat een waardplant de genetische dispositie voor resistentie merkbaar zal beïnvloeden.

Garman (1950) stelde vast, dat een parathion-resistente spintpopulatie van roos na enkele generaties op boon zijn resistentie verloren had. Dit verschijnsel wordt door Smith & Fulton (1951) verklaard, doordat de resistente populatie van Garman heterozygoot zou zijn en dus het verlies van resistentie niet gecorreleerd was met de wisseling van waardplant. In de proeven van Smith & Fulton bleef daarentegen het van roos afkomstige spint ook op boon volledig resistent tegen parathion. In dit geval zou de resistentie homozygoot zijn.

Neiswander et al. (1950) doen mededelingen over de invloed, die van de waardplant uitgaat. Zij vonden dat populaties, welke op roos, tomaat en boon gekweekt werden, een verschillende gevoeligheid ten opzichte van acariciden

vertoonden. Het spint van boon was gevoeliger dan dat van tomaat en dat van tomaat gevoeliger dan dat van roos. Het behoeft geen betoog, dat dit met de in dit artikel besproken resistentie niets te maken heeft. Ook COLE & FISK (1955) stelden de invloed van de waardplant op de gevoeligheid voor bepaalde middelen vast. DOSSE (1952) vestigt de aandacht op het verschil in gevoeligheid tussen het spint van anjer (welke hij beschouwt als *T. urticae forma dianthica*) en het spint van hop en verklaart dit ook uit het verschil in waardplant. Deze bewering is weinig steekhoudend, daar DOSSE werkte met anjerspint, dat resistent geworden was tegen folidol en dit ten onrechte vergeleek met het normaal gevoelige spint van hop. Uit onze gegevens blijkt dat er geen verschillen in resistentie tussen spint van roos en anjer bestaan. In dit opzicht gedraagt het spint zich op beide planten gelijk.

4. Resistentie tegen demeton (Systox) is niet overal even groot.

Het schijnt dat onder de organische fosforverbindingen demeton ten aanzien van de resistentie voor deze groep een bijzondere plaats inneemt, daar op enkele bedrijven (b.v. H, K en M) het spint een duidelijke gevoeligheid voor dit middel laat zien. Ook FJELDDALEN & DAVIKNESS (1952) en DOSSE (1952) constateren dat een parathion-resistentie nog geen resistentie voor demeton impliceert.

5. Er werd resistentie gevonden tegen phosdrin, thiometon en phemkapton, ofschoon de betreffende mijtpopulaties er nooit mee behandeld waren. Deze populaties waren resistent geworden na behandeling met andere organische fosforverbindingen.

Dit verschijnsel is ook in de U.S.A. geconstateerd, o.a. door SMITH (1956).

6. Resistentie van het spint tegen gechloreerde koolwaterstoffen treedt in Aalsmeer nog niet op.

In alle onderzochte gevallen bleken kelthane en chloorbenzilaat normaal werkzaam te zijn.

Resistentie tegen gechloreerde koolwaterstoffen is in de U.S.A. reeds lang een feit (SMITH, 1956; JEFFERSON & MORISHITA, 1957). De huidige chemische bestrijding van het spint in Aalsmeer berust op het gebruik van chloorbenzilaat, in combinatie met oviciden. Zou een resistentie tegen chloorwaterstoffen optreden, dan zou de spintbestrijding in Aalsmeer in ernstige moeilijkheden geraken.

SAMENVATTING

Bij een onderzoek naar de gevoeligheid voor acariciden van spintpopulaties, afkomstig van verschillende bedrijven in Aalsmeer, bleek in 20 van de 22 onderzochte gevallen een resistentie te bestaan tegen organische fosforverbindingen. Deze resistentie bleek ook te bestaan ten opzichte van organische fosforverbindingen, die nooit eerder tegen de onderzochte spintpopulaties gebruikt waren. De resistentie tegen demeton (Systox) bleek bij enkele populaties niet even groot.

Tegen acariciden op basis van gechloreerde koolwaterstoffen zoals kelthane en chloorbenzilaat, werd nog geen resistentie bij de onderzochte populaties aangetroffen.

Een onderzoek naar de gevoeligheid voor acariciden van spintpopulaties, welke in de directe omgeving buiten de kassen op onkruiden e.d. voorkomen,

leidde tot de conclusie dat resistente spintmijten niet buiten de kas voorkomen. De resistentie van spintpopulaties is op de verschillende bedrijven in Aalsmeer zelfstandig spontaan opgetreden. Er bleek geen correlatie te bestaan tussen de verschillende waardplanten (roos, anjer en *Gerbera*) en het optreden van resistentie.

SUMMARY

During the year 1958 the susceptibility to acaricides of a number of populations of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* AUCT.) occurring in several nurseries in Aalsmeer (fig. 5) was studied at the Experimental Station for Floriculture at Aalsmeer, The Netherlands.

The susceptibility of a population was examined by placing 50 adult female mites on a bean plant, treated with an acaricide. The percentage mortality was determined after four days.

In these experiments both spider mite populations in the greenhouses (on roses, carnations and *Gerbera*) and those in the open air near the greenhouses (on weeds) were studied. Fig. 1 gives the susceptibility of the different populations for water, parathion, diazinon, demeton (Systox) and kelthane. Of the 22 populations from glasshouses 20 proved to be resistant to organic P-compounds. Of those collected from weeds growing outside the greenhouses, not a single one proved to be resistant, so that it may be taken for granted that the resistant red spider mite, found in the greenhouse, does not survive outside.

A number of populations were examined for their susceptibility to some other acaricides (fig. 2). In this experiment the resistance to those organic P-compounds with which the populations had never been treated before, such as phosdrin, thiometon and phenkapton was observed. It clearly illustrates that there is no question of resistance to a definite acaricide, but to the group of organic P-compounds. Resistance to demeton did not prove to be equally strong for every population.

In all cases examined chlorinated hydro-carbons, such as kelthane and chlorobenzilate, proved to be normally active. Resistance to this group of acaricides has not yet been found in Aalsmeer.

A special case is stated in fig. 3, where the spider mite population in a cucumberhouse, in which no chemical control had been applied, is compared with a population on nettles outside the glasshouse and a resistant population in a rosehouse of the same nursery.

An experiment, repeated on several dates over a period of 13 months (fig. 4), shows that there was no important shift in the susceptibility of the population studied. It is clear that the resistance of two-spotted spider mites to organic P-compounds has been developed in Aalsmeer independently in more than twenty separate glasshouses.

In no case the host plant (carnation, rose, *Gerbera*) proved to have an appreciable influence on the appearence of resistance.

DANKBETUIGING

De schrijver betuigt gaarne zijn dank aan Dr. P. A. VAN DER LAAN, Lector voor Toegepaste Entomologie van de Universiteit te Amsterdam, voor vele suggesties en adviezen.

Cole, C. E. & F. W. Fisk, – 1955. Comparative toxicity of certain acaricides to the carmine and green forms of the two-spotted spider mite. J. econ. Ent. 48: 85–87.

Dosse, G., – 1952. Die Gewächshausspinmilbe Tetranychus urticae Koch forma dianthica und ihre Bekämpfung. Höfchen-Briefe 5: 238–267.

Fjelddalen, J. & T. Davikness, – 1952. Veksthusspinnmidder resistente mot thiofosformidler funnet i Norge. Gartneryrket 13.

Garman, P., 1950. Parathion resistant red spiders, J. econ. Ent. 43: 53–56.

Jefferson, R. N. & F. S. Morishita, – 1956. Azobenzene-aramite and azobenzene-chlorobenzilate sprays for resistant spider mites on greenhouseroses. J. econ. Ent. 49: 151–153.

Lees, A. D., – 1953. Environmental factors controlling the evocation and termination of diapause in the fruit tree red spider mite Metatetranychus ulmi Koch. Ann. appl. Biol. 40: 449–486.

Marle, G. S. van, – 1951. Spintbestrijding met moderne insecticiden in de Aalsmeerse bloementeelt. Inst. v. Plantenziektenk. Onderz. Meded. no. 18.

Meltzer, J., – 1956. Multiresistentie bij de kamervlieg, Musca domestica L., opgewekt door selectie met insecticiden. Landbouwhogeschool, Gent. Meded. 21: 459–482.

Neiswander, C. R., J. G. Rodriquez & R. B. Neiswander, – 1950. Natural and induced variations in two-spotted spider mite populations. J. econ. Ent. 43: 633–636.

Smith, F. F. & R. A. Fulton, – 1951. Two-spotted spider mite resistant to aerosols. J. econ. Ent. 44: 229–233.

Smith, F. F., – 1956. Chemical control of spider mites and the genetics of resistance. University of Maryland. Rec. appl. Acar.: 11.

T. Pl.ziekten 65 (1959): 116-118

THE EVALUATION OF ANTI-COAGULANTS AS RODENTICIDES IN THE LABORATORY[1]

Met een samenvatting:

Het laboratoriumonderzoek van anti-coagulanten als rodenticiden

BY

F. E. Loosjes

Plant Protection Service, Wageningen

Everyone who wishes to market a pesticide in The Netherlands must have a licence, issued by the Director of Agriculture of the Ministry of Agriculture. To get such a licence a sample of the pesticide involved, its composition, directions for use, etc. have to be delivered at the Plant Protection Service. This regulation came into force in October 1948 and since that time all insecticides, acaricides, rodenticides etc. are screened for licensing in the laboratory and in practice. In this article we shall deal with rodenticides in particular.

Among rodenticides, arsenic compounds, strychnine, thallous sulphate, zincphosphide and red squill are known for a considerable time. When these substances are given, sufficient quantities should be eaten by the animals in the first day of intake in order to kill them. If insufficient dosages are eaten during the first time, the animals may only become ill and can get an abhorrence of the toxic substance concerned. It is possible that other specimens of the population also become suspicious and refuse to take up the poisoned food.

Within the last ten years anti-coagulants which make the bloodvessels pervious and prevent clotting of the blood have been added to the known series of rodenticides. The advantages of these substances are that the animals do not get any bait shyness so that they can be fed several days in succession until they are killed by internal bleeding. As a result the mortality of a population outnumbers that caused by other poisons. Furthermore one initial dosage is generally not sufficient to kill an animal; more uptakes are necessary.

This fact makes these anti-coagulants rather safe in use; accidental uptakes are usually without deadly effect. Moreover one gets the impression that killing rats by an anti-coagulant is in most cases much less repulsive than e.g. by scilla. As in addition anti-coagulants can be used economically it will be clear that among the rodenticides (offered for investigation) they soon held an important position so that methods for testing them in the laboratory had to be worked out. But it is also evident that these methods should differ from those used in the case of the classical rodenticides.

A starting-point for a testing-scheme was found in the work of Hayes & Gaines (1950). Of course our methods have altered since, following various other publications and as a result of our own experience.

We are evaluating anti-coagulant rodenticides now by means of the following methods:

[1] Accepted for publication 24 February 1959.

1. Estimation of the percentage of active substance in the chemical laboratory.
2. Stomach-tube tests to get information on the acute toxicity of new types of anti-coagulants to study the hazards for domestic animals, etc.
3. Estimation of the survival-time after daily intake until death. A series of increasing percentages of active substance in the food is given. Usually from 0.78 up to 800 p.p.m. is administered; the next percentage is always twice the previous one. Each of five or more rats is offered daily 20 g of poisoned food holding the same amount of anti-coagulant. Every day the intake is fixed. The results are plotted in log. dosage-survival-time curves, as far as the killed rats are concerned. An average survival-time of all members of a series of five cannot be given if one or more individuals survive. To overcome this difficulty we use according to POWERS (1918) the reciprocal value: $\frac{100}{S}$, which gives for the survivers $\frac{100}{S} = 0$. This so-called velocity of fatality is plotted with the log. dosage. In this way one gets an easy information on the smallest dose that gives the shortest survival time. This test is only done with new types of anti-coagulants.
4. Tests in which the animals are fed during a limited number of days. Brown rats are usually fed during three days, black rats and mice during five or seven days. They are usually fed with the amount of toxic substance prescribed in practice, incorporated in 20 g laboratory food for rats and in 5 g laboratory food for mice. The daily intake is registered. In this way we get an information on the lethal feeding period of a new brand, whether it is up to the standard or not.
5. Interruption-tests, i.e. tests in which the animals are fed every other day, every third or every fifth day. Again the daily intake is noted, also that of the plain bait of the interim days. Thus information is obtained on the influence of irregular intake of a bait under field conditions. In this connection it should be considered that one product might be excreted more rapidly than another. Also one product may accumulate more than another. The method also may give some information on the acceptance of the bait.
6. Acceptance experiments in which individually caged rats have a choice of food out of four containers. After feeding three to six days on oats, containers 1 and 3, or 2 and 4 (or another combination) are filled with the bait to be tested, while oats or laboratory food are given in the others. The daily intake is fixed regularly. The next day the bait is put in the alternating containers and oats in the other ones. Then all containers are filled again with oats for 3 to 6 days. Always the same amount (10 g) of food or bait is offered per container. Brown rats are given 3 days oats and 1 day a choice between oats and bait alternating. Black rats and house mice are given 6 days oats and 2 days a choice.
   Each product is tested on brown and black rats and on mice.

All brown or black rats are caught in the field and are first accustomed to laboratory cages and food before they are used in trials. The weight is taken at the start and at the end of an experiment. The animals are always caged separately and have fresh water available. The sex is determined. So far we could not find much difference between the susceptibility of both sexes for

anti-coagulants. Neither did we find indications in the literature in this respect.

Pregnant rats are not used in the experiments. Groups of rats of comparable weight are used for each separate treatment. Rats that have survived an experiment are killed. All symptoms are carefully noted and a *post-mortem* examination is made. White rats are used if there is a lack of wild animals or if we need animals of about the same weight for means of comparison.

Of course laboratory results are checked in practice as much as possible, especially when there is a reason for refusing the licence.

SAMENVATTING

Het onderzoek van anti-coagulanten als rodenticiden in het biologisch laboratorium van de Plantenziektenkundige Dienst, als onderdeel van de middelenkeuring ten behoeve van de bestrijdingsmiddelenwetgeving, wordt volgens de hierbij beschreven methoden uitgevoerd. Naast de chemische bepaling van het gehalte aan giftig bestanddeel wordt de giftigheid nagegaan in maagsondeproeven na éénmalige toediening (LD 50). Verder wordt de sterftetijd vastgesteld: bij het geregeld dagelijks opnemen van vergiftigd voedsel, tot de dood intreedt; bij dagelijks opnemen gedurende enkele dagen (3, 5 of 7 dagen-proeven) en bij opnemen van vergiftigd voedsel, afgewisseld met opnemen van niet-vergiftigd voedsel (onderbrekings-proeven). Ten slotte worden keuzeproeven gedaan om een eventuele afkeer van de dieren voor de middelen te kunnen vaststellen.

REFERENCES

ARMOUR, J. C. & S. A. BARNETT, – 1950. The action of dicoumarol on laboratory and wild rats and its effect on feeding behaviour. J. Hygiene 48: 158–170.

BENTLEY, E. W., L. E. HAMMOND & E. J. TAYLOR, – 1955. The comparative toxicity of 0.025 per cent and 0.005 per cent warfarin to Rattus norvegicus. Pl. Path. 4: 120–123.

BENTLEY, E. W. & M. ROWE, – 1956. Pival, an anti-coagulant rodenticide. J. Hygiene 54: 20–27.

HAYES, W. J. & F. B. GAINES, – 1950. Control of norway rats with residual rodenticide warfarin. Publ. Health Rep. 65: 1537–1555.

REIFF, M. & R. WIESMANN, – 1951. Untersuchungen über ein neues Rodentizid mit kumulativer Wirkung auf Basis der Cumarinderivate. Acta tropica 8: 97–130.

STEINIGER, F., – 1953. Ueber die Wirksamkeit des „Fumarins", eines neuen Anti-Koagulans zur Rattenbekämpfung und sein Vertrüglichkeit für Haustiere. Nachr.-Bl. dtsch. Pfl.-Sch.-D. 5: 167–168.

TAMMES, P. M. L. & H. DE VRIES, – 1955. Het beoordelen van anticoagulanten op basis van de sterftetijd. Versl. Plantenziektenkundige Dienst.

Stolbur a príbuzné vírusové bezsemennosti rastlín. Stolbur and similar virus diseases causing seedlessness of plants. – Proceedings of the scientific conference on stolbur and similar diseases causing sterility, September 17th to 18th 1956 at Smolenice. Published by the Slovak Academy of Sciences, Bratislava 1958, 244 pp. (overwegend Tsjechisch en Slowaaks met uitvoerige Russische, Duitse en Engelse samenvattingen).

De heksenbezemvirusziekten vormen niet alleen uit wetenschappelijk, maar vooral ook uit economisch oogpunt, een zeer belangrijke groep van virusziekten met een wereldwijde verbreiding. Deze virusziekten zijn gekenmerkt door afwijkingen in de uitwendige bouw der aangetaste planten, zoals heksenbezemgroei en bloemoplossingsverschijnselen. Deze laatste afwijkingen geven aanleiding tot het achterwege blijven van vrucht- en zaadvorming. Vandaar de voor deze ziekten wel gebruikte, minder fraaie namen „virus diseases causing seedlessness or sterility" en „Samenlosigkeiten".

De heksenbezemvirusziekten genieten een toenemende belangstelling. Hiervan getuigt het feit, dat in 1956 een internationale conferentie werd gehouden over „stolbur en verwante ziekten". Stolbur is nl. een uitermate belangrijke vertegenwoordiger van deze groep van ziekten. De ziekte is in 1933 voor het eerst vastgesteld door RISCHKOV e.a. op de Krim en veroorzaakt thans grote schade in vele *Solanaceae* in vrijwel geheel centraal en zuidoost Europa. Er zijn zelfs aanwijzingen dat het verbreidingsgebied reeds groter is.

Genoemde conferentie werd georganiseerd door de landbouwkundige sectie van de Slowaakse Academie van Wetenschappen in samenwerking met de Tsjechoslowaakse Academie van Wetenschappen en de Tsjechoslowaakse Academie voor Landbouwwetenschap. Er waren 70 deelnemers, hoofdzakelijk uit Tsjechoslowaakse wetenschaps- en landbouwkringen, terwijl bovendien een deelnemer, tevens referent, aanwezig was uit Schotland, Joegoslavië, Hongarije en Oost-Duitsland. De 16 voordrachten zijn thans gebundeld. Iedere voordracht is daarin voorzien van uitvoerige samenvattingen in het Russisch, Duits en Engels. Waar vele der bijdragen tevens een samenvattend overzicht geven van reeds eerder in voor de meesten onzer niet toegankelijke talen gepubliceerd onderzoek, moet deze opzet gelukkig worden geacht.

Uit de voordrachten blijkt dat in Tsjechoslowakije naast stolbur (ook wel „zuid-stolbur" genoemd) en een heksenbezemziekte van de aardappel (minder juist ook wel „noord-stolbur" genoemd) tevens andere nog niet geïndentificeerde heksenbezemziekten voorkomen bij talrijke onkruiden en sierteeltgewassen. Vooral stolbur blijkt van grote economische betekenis te zijn en in dit land de belangrijkste oorzaak van degeneratie bij aardappelen te vormen. Zo werd het in Tsjechoslowakije bij aardappelen veroorzaakte jaarlijkse verlies geschat op de opbrengst van 10.000 ha of 100.000 ton.[1] In de warmere delen van het land komen opbrengstdalingen voor van 30–50 %. Soms zijn aardappelvelden voor 100 % geïnfecteerd. Behalve bij aardappelen is stolbur vooral van beteke-

[1] In een recentere publikatie (BOJŇANSKÝ & KOSLJAROVÁ, Rostl. výr. 5, 1959: 125) wordt de gemiddelde, jaarlijkse, in dit land veroorzaakte schade reeds geschat op de opbrengst van ruim 32.000 ha, terwijl in droge, warme jaren de verliezen nog 2 à 3 maal hoger kunnen zijn.

nis bij tomaat, tabak en spaanse peper (paprika). In het noorden van Bulgarije b.v. komen in dit laatste gewas aantastingen van 90 % voor.

Behalve de problemen rondom de epidemiologie en de economische betekenis van stolbur en verwante ziekten in Tsjechoslowakije, Joegoslavië, Hongarije en Bulgarije, waarbij speciale aandacht werd besteed aan het optreden van stolbur in aardappelen en tabak, werden de volgende onderwerpen besproken: het voorkomen van een heksenbezemziekte van aardappel en verwante ziekten in Groot-Brittannië en van gelijksoortige nog van geringe betekenis zijnde ziekten in Duitsland; de relatie tussen stolbur en een aantal andere heksenbezemziekten, in het bijzonder die van de aardappel in Tsjechoslowakije; draadspruiten bij aardappel; het niet spruiten van aardappelknollen als een der symptomen van stolbur; de serologie van stolbur; de fysiologie van stolburzieke planten en tenslotte de fermentatie van stolburzieke tabak.

Met het oog op de ernstige aard van deze ziekten werd in een slotresolutie voorgesteld de problemen internationaal aan te pakken. Het bestuderen van de heksenbezemvirusziekten in elk land waar deze worden waargenomen, werd aanbevolen. Daar van de onderlinge relatie en de juiste identiteit van deze ziekten nog weinig bekend is, zou door internationale samenwerking de classificatie moeten worden verbeterd.

Nu ook in Nederland heksenbezemvirusziekten bekend zijn (de heksenbezemziekte van de framboos en de heksenbezemziekte (vergroening) van klaversoorten), behoeft – na het voorgaande – kennisneming van dit verslag geen verdere aanbeveling. L. Bos